

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Departamento de Química Biológica
Cátedra de Química Biológica Vegetal

Mecanismos reguladores del crecimiento durante la fase post-germinativa de plantas de *Triticum aestivum* L. (trigo) sometidas a condiciones ambientales desfavorables: balance redox y ajuste osmótico celular

Ing. Agr. Roberto Barcia

Directora: Dra. Susana Mabel Gallego
Codirectora: Dra. María Patricia Benavides

2014

A mis amores: Vivi, Luciano, Ceci y Fabri.

A mi mamá.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me han brindado los medios y el lugar para desarrollar este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Agronomía y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica que me formaron profesional y científicamente.

A Susana Gallego y a Patricia Benavides que me guiaron y dirigieron en esta Tesis y especialmente porque fueron quienes me formaron como investigador y me apoyaron en los momentos más complicados. Y por haber defendido y mantenido en todo momento y ante toda circunstancia la verdad, la decencia y el espíritu de trabajo.

A Irene Rezzano que pensó en mí y me abrió el camino para la docencia y la investigación.

A Carla Zilli que me guió en mis primeros pasos por el Laboratorio.

A Liliana Pena, mención especial, por haberse dedicado con profesionalismo, paciencia y generosidad sin límites a enseñarme todas las técnicas y metodologías puestas en práctica en este trabajo de Tesis y aconsejarme en los arduos caminos de la burocracia institucional y principalmente por su amistad.

A mi compañero y amigo Diego SantaCruz con quien compartí todos estos años.

A Silvana Díaz Herrera y Andrea Mendez por su aporte fundamental en hacer de la cátedra un ambiente amistoso y de discusión.

A Daniela Groppa y Myriam Zawoznik que aportaron tanto a mi formación y que lograron hacer cómoda mi estadía en esta cátedra.

A Florencia Iannone, Claudia Azpilicueta y Eliana Rosales que me acompañaron desde mis inicios y colaboraron para hacerme las cosas más fáciles.

A Karina Balestrase con quien colaboré en los primeros momentos.

Y finalmente a George, Paul, John y Ringo que me acompañaron y acompañan en todo momento de este trabajo y en todos los momentos de mi vida.

Los resultados presentados en esta Tesis han sido parcialmente publicados en los trabajos científicos que se detallan a continuación

Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. 2012. Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik MS, Groppa MD, Benavides MP. Environmental and Experimental Botany 83, 33-46.

Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings. 2012. Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Méndez AA, Gallego SM. Plant Science 196, 1-7.

Osmotic adjustment and maintenance of the redox balance in root tissue may be key points to overcome a mild water deficit during the early growth of wheat. 2014. Barcia RA, Pena LB, Zawoznik MS, Benavides MP, Gallego SM. Plant Growth Regulation

Abreviaturas

APX = ascorbato peroxidasa
ASC = ácido ascórbico
CAT = catalasa
Cyc = ciclinas
CDK = kinasas dependientes de ciclinas
CSPA = Continuo Suelo Planta Atmósfera
DAB = 3,3' diamino bencidina
DHA = ácido dehidroascórbico
EAO = especies activas del oxígeno
GPX = guayacol peroxidasa
MPa = megapascuales
MSR = masa seca relativa
PA = poliaminas
PAGE = gel de poliacrilamida
PEG = polietilenglicol
PF = peso fresco
PS = peso seco
Put = putrescina
RAM = meristema apical de la raíz
rpm = revoluciones por minuto
SOD = superóxido dismutasa
Spd = espermidina
Spm = espermina
TBARS = sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
Ub = ubicuitina
VEA = velocidad de elongación absoluta
VCR = velocidad de crecimiento relativa

Indice

	Página
Capítulo 1. Introducción.	
Introducción	1
1. El crecimiento vegetal	2
1.1. Mecanismos de control de la proliferación celular	3
1.1.1. Sistema ubiquitina proteasoma	7
1.1.2. Control de la progresión G1-S	8
1.2. Mecanismos de control de la expansión celular	10
1.3. Crecimiento y medio ambiente	12
2. Homeostasis redox celular	13
2.1. Especies activas del oxígeno	13
2.1.1. Las especies activas del oxígeno y el daño a macromoléculas	14
2.1.1.1. Peroxidación lipídica	14
2.1.1.2. Oxidación de proteínas	15
2.1.1.3. Daño al ADN	16
2.1.2. Las EAO y los procesos de señalización	16
2.2. Sistema de defensa antioxidante	17
2.2.1. La catalasa	19
2.3. Balance redox y estrés oxidativo	20
3. Condiciones ambientales desfavorables: los metales y la restricción hídrica	21
3.1. La contaminación por metales	21
3.1.1. Los metales y las plantas	23
3.1.1.2. Las plantas y su propensión natural por los metales	23
3.1.1.3. Síntomas de toxicidad producidos por los metales en las plantas	24
3.1.2. El cadmio	26
3.1.2.1. Forma de ingreso, transporte y acumulación del cadmio en plantas	27
3.1.2.2. Toxicidad en la planta	28
3.1.3. El cobre	28
3.1.3.1. Forma de ingreso, transporte y acumulación del cobre en plantas	29
3.1.3.2. Toxicidad en la planta	29
3.2. La restricción hídrica	30
3.2.1. Contexto mundial	30
3.2.2. Contenido de agua del suelo	31
3.2.3. Caracterización energética: Potencial agua	32
3.2.4. Relación agua-suelo-planta-atmósfera	33
3.2.5. Potencial agua en la planta	34
3.2.6. Factores abióticos que alteran el estado hídrico de la planta	36
3.2.7. Estrategias de las plantas para contrarrestar el déficit hídrico	36
3.2.7.1. El ajuste osmótico	37
3.2.7.2. Otros mecanismos de aclimatación	38
4. El trigo	39
4.1. Sistema radicular de trigo	41
Capítulo 2. Objetivos e hipótesis	
Objetivos e hipótesis de la investigación	42

Capítulo 3. Materiales y métodos.

Materiales y métodos

1. Reactivos	44
2. Material vegetal	45
2.1. Modelo de metales (cadmio y cobre), H ₂ O ₂ y metilviológeno	45
2.2. Modelo de restricción de agua: condiciones de cultivo y tratamientos	46
2.2.1. Ensayo con poliaminas y nitroprusiato de sodio	47
3. Métodos	48
3.1. Índice de germinación	48
3.2. Largo total del coleoptile y de la raíz	48
3.3. Determinación de biomasa	48
3.4. Cortes histológicos y estimación del largo de células	49
3.5. Conductividad	49
3.6. Osmolalidad	49
3.7. Cuantificación del contenido de prolina	49
3.8. Determinación del contenido de hidratos de carbono	50
3.9. Coloración de azul de Evans	50
3.10. Localización de especies activas del oxígeno <i>in situ</i> en raíces	51
3.10.1. Tinción con 3,3-diaminobencidina	51
3.10.2. Tinción con sal de azul de nitro-tetrazolio	51
3.10.3. Tinción con sondas fluorescentes	51
3.11. Actividad de enzimas antioxidantes	52
3.11.1. Catalasa	52
3.11.1.1 Determinación espectrofotométrica	52
3.11.1.2. Determinación en geles (zimogramas)	52
3.11.2. Superóxido dismutasa	53
3.11.3. Ascorbato peroxidasa	53
3.11.4. Guayacol peroxidasa	54
3.12. Proteínas solubles totales	54
3.12.1. Cuantificación por el método de Bradford	54
3.12.2. Geles de poliacrilamida	54
3.13. Determinación del nivel de expresión de ciclina D, CDKA y 20S proteasoma	55
3.14. Determinación de proteínas oxidadas	56
3.14.1. Grupos carbonilo totales	56
3.14.2. Grupos carbonilo: ciclina D, CDKA y 20S proteasoma	57
3.15. Proteínas conjugadas con ubiquitina	58
3.15.1. Niveles de ubiquitinación total	58
3.15.2. Niveles de ubiquitinación específicos: ciclina D y CDKA	58
3.16. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	59
3.17. Cuantificación de los niveles de los transcritos: RT-PCR	59
3.17.1. Extracción de ARN	59
3.17.2. Determinación de la calidad del ARN	60
3.17.3. Síntesis de ADNc	60
3.17.4. Reacción en cadena de la polimerasa	61

3.18. Análisis estadístico	62
4. Instrumental	62
5. Informática	63
5.1 Bioinformática	63
5.2. Software	63
Capítulo 4. Metales.	
Resultados	
1. Cadmio, metilviológeno y peróxido de hidrógeno	64
1.1. Efecto de los tratamientos sobre los parámetros de crecimiento	64
1.2. Producción de especies activas del oxígeno	66
1.3. Oxidación y conjugación con ubicuitina de proteínas	68
1.3.1. Análisis sobre el total de las proteínas solubles	68
1.3.2. Análisis de proteínas específicas	69
1.4. Efecto del cadmio y las EAO sobre la acumulación de transcritos relacionados con proteínas del ciclo celular	71
1.5. Efecto del cadmio y las EAO sobre la acumulación de transcritos de expansinas de expresión radicular	72
1.6. Contenido de prolina	72
2. Cobre	73
2.1. Efecto del cobre parámetros de crecimiento	73
2.2. Producción de especies activas del oxígeno	75
2.3. Oxidación y conjugación con ubicuitina de proteínas	77
2.3.1. Análisis sobre el total de las proteínas solubles	77
2.3.2. Análisis de proteínas específicas	77
2.4. Efecto del cobre sobre la acumulación de transcritos relacionados con proteínas del ciclo celular	79
2.5. Efecto del cobre sobre la acumulación de transcritos de expansinas de expresión radicular	79
2.6. Contenido de prolina	80
Discusión	
3. Los metales y los agentes oxidantes	81
3.1. El crecimiento	81
3.2. El balance redox en el ápice de la raíz	82
3.3. La proliferación y la expansión celular	84
Capítulo 5. Restricción hídrica.	
Resultados	
1. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros de crecimiento	89
1.1. Índice de germinación	89
1.2. Longitud de la raíz y del coleoptile	89
1.3. Análisis de la biomasa	92
1.4. Evaluación del largo de células en el RAM	94
1.5. Acumulación de transcritos relacionados con proteínas del ciclo celular	95
1.6. Acumulación de transcritos relacionados con proteínas de la pared celular	96
2. Efecto de la restricción hídrica sobre el contenido de proteínas solubles	97

3. Asociación entre el estrés hídrico y el balance redox	98
3.1. Determinación de las especies reactivas del oxígeno y muerte celular	98
3.2. Evaluación de la peroxidación lipídica y del daño oxidativo a proteínas	99
4. Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante	100
4.1. Actividad superóxido dismutasa, guayacol y ascorbato peroxidasas	100
4.2. Estudio de la enzima catalasa: zimograma, actividad absoluta y específica	104
4.3. Cuantificación del nivel de transcriptos de catalasa	106
5. Relación entre el déficit hídrico y la producción de ajuste osmótico	108
5.1. Análisis de la osmolalidad	108
5.2. Análisis de la conductividad	108
5.3. Modificaciones en el contenido de prolina e hidratos de carbono solubles	110
6. Efecto del agregado de poliaminas	113
7. Análisis de variedades trigo especie aestivum	117
7.1. Longitud y biomasa del coleoptile y la raíz	117
7.2. Actividad específica de catalasa	120
7.3. Contenido de prolina	121
Discusión	
8. Restricción hídrica	123
8.1. El crecimiento	123
8.2. La proliferación y la expansión celular	125
8.3. El balance redox	128
8.4. El ajuste osmótico	130
8.5. Agregado exógeno de poliaminas y nitroprusiato de sodio	132
8.6. Respuesta a la restricción hídrica de diferentes variedades trigo especie aestivum	134
Capítulo 6. Conclusiones.	
Conclusiones	135
Perspectivas	138
Referencias	139
Resumen	140

Capítulo 1

Introducción

Introducción

Las plantas, por tratarse de organismos sésiles, están de manera continua expuestas a cambios en las condiciones ambientales. Es por ello que a lo largo de la evolución se diversificaron para adaptarse a un determinado rango de variaciones tanto climáticas como edáficas.

Pero también, de manera asombrosa, desarrollaron complejos mecanismos para monitorear el ambiente en el que viven, reprogramando de forma dinámica su metabolismo y crecimiento según sus necesidades.

En este contexto, entender los mecanismos que regulan el crecimiento de las plantas cuando se encuentran expuestas a ambientes desfavorables puede considerarse un aspecto fundamental en el mundo actual, donde los sistemas naturales están siendo sometidos cada vez más a mayores presiones y cambios que operan a una velocidad sin precedentes como consecuencia del accionar del hombre, lo cual origina que las zonas productivas se estén extendiendo a regiones consideradas subóptimas para el crecimiento de especies vegetales de interés comercial.

En este capítulo se brindará un breve estado del conocimiento acerca de los temas centrales involucrados en este trabajo de Tesis, que son aspectos relacionados al crecimiento vegetal, a la homeostasis redox celular, la descripción de factores ambientales adversos para el crecimiento (como son el exceso de metales y la deficiencia de agua), así como algunas características relevantes del trigo, la especie de interés agronómico seleccionada para realizar este trabajo.

1. El crecimiento vegetal

El crecimiento en las plantas está concentrado en regiones que contienen células en activa división denominados meristemas. En las plantas jóvenes los meristemas más activos son los apicales, que se localizan en los extremos del tallo y de la raíz. La actividad de los meristemas apicales dará origen a nuevos órganos y a la forma básica de la planta, y es considerado el crecimiento primario del vegetal. El crecimiento secundario involucra dos meristemas laterales: el cambium vascular y el del felógeno (Taiz y Zeiger 2010).

El meristema apical de la raíz (*root apical meristem*, RAM) consiste en un dominio de células en proliferación, donde las células tienen una alta probabilidad de dividirse, seguido de un dominio de transición donde las células poseen una baja probabilidad de división pero no han comenzado aún la rápida elongación, zona conocida como meristema basal (Ivanov y Dubrovsky 2013), Figura 1.1.

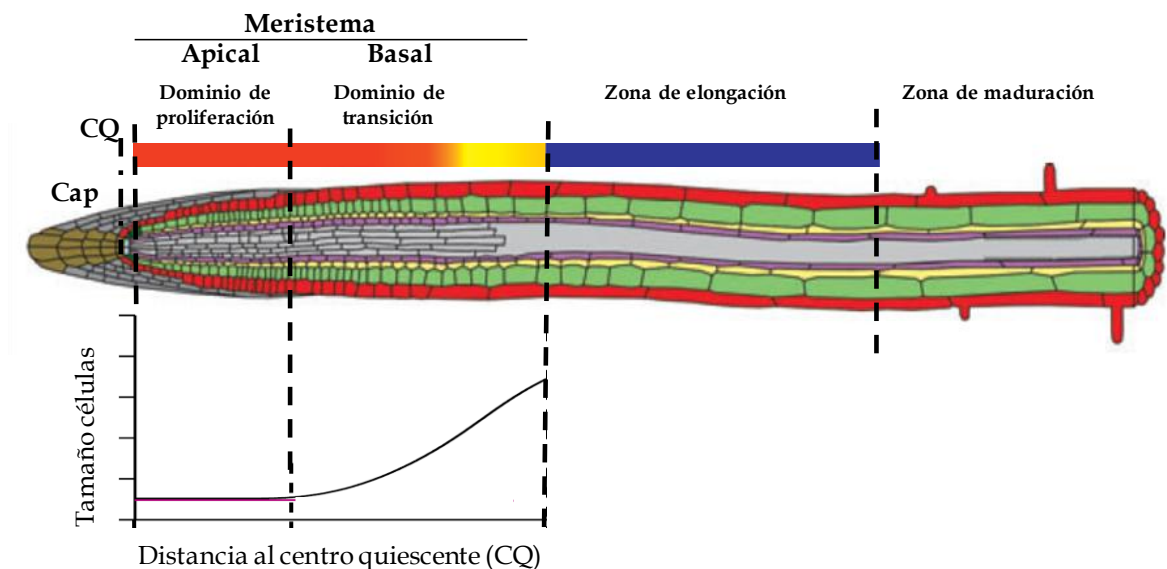


Figura 1.1. Representación esquemática de una sección longitudinal de la región apical de la raíz (tomado y adaptado de Ivanov y Dubrovsky 2013).

En la extremidad de la raíz la proliferación celular es relativamente lenta, esta región es llamada centro quiescente y está compuesto de células madres. Luego de unas pocas generaciones de división lenta, las células se desplazan comenzando a dividirse de manera más rápida. Las células meristemáticas que están localizadas cerca del extremo de la raíz se dividen tanto en la dirección de la

punta de la raíz, para formar el capuchón de la misma, como de igual manera en ambas direcciones laterales de la base de la raíz. En la zona proximal, y superponiéndose con la región meristemática, se encuentran las zonas de elongación en las cuales las células incrementan dramáticamente su largo, y se produce un anillo central denominado endodermis. Las paredes celulares de la capa de células endodermiales se adelgazan y se deposita suberina en las paredes radiales formando la Banda de Caspary, una estructura hidrofóbica que evita el movimiento apoplástico de agua y solutos en la raíz. La endodermis divide a la raíz en dos regiones, la corteza hacia afuera y la estela hacia adentro. La estela contiene los elementos vasculares: xilema y floema. Los pelos de la raíz, que ofrecen una amplia superficie de absorción de agua y solutos, aparecen por primera vez en la zona de maduración formándose en las células epidérmicas, donde el xilema desarrolla gran capacidad de transportar agua y solutos a la parte aérea de la planta (Taiz y Zeiger 2010).

El modelo integrado de crecimiento (célula-organismo) propone que las células individuales son las unidades de la morfogénesis vegetal a través de su actividad de división y expansión (Beemster y col. 2003).

1.1. Mecanismos de control de la proliferación celular

La proliferación celular es la fuerza primaria que lleva al crecimiento de las plantas. La división celular está regida por el ciclo celular, que es el proceso por el cual las células se reproducen a sí mismas y a su material genético nuclear. El ciclo celular comprende cuatro etapas o fases: Gap1 (G1), síntesis de DNA (S), Gap 2 (G2) y la fase mitótica (M). De manera interesante, el mecanismo bioquímico que regula la progresión de las células a través de su ciclo de división se encuentra altamente conservado en la evolución y las plantas retuvieron los componentes básicos del mismo (Roeder 2012).

Las kinasas dependientes de ciclinas o CDK (de *cyclin dependent kinase*) son las enzimas que controlan tanto la entrada de células que no se encuentran en división (G0) al ciclo, así como la transición entre las diferentes fases del ciclo celular. Estas proteínas relativamente pequeñas, con una masa molecular que va

de 34 a 40 kDa, catalizan la fosforilación de otras proteínas blanco del ciclo celular utilizando ATP como dador del grupo fosfato (Francis 2007). Como su nombre lo indica, para ser enzimas activas las CDK dependen de su unión con proteínas no catalíticas denominadas ciclinas (Cyc). Y es basado en el reconocimiento del dominio proteico que une a las ciclinas que en la actualidad se clasifica a las CDK de plantas en ocho clases: de A a G y L (CDKA a CDKG y CDKL) (Tank y Thaker 2011).

Las Cyc son reguladores positivos de las CDK, pero no sólo activan las CDK mediante cambios de conformación en el sitio catalítico sino también contribuyen a la selección de los sustratos, a la localización subcelular del complejo Cyc/CDK y a la regulación de la estabilidad de la proteína (Criqui y Genschik 2002). Las Cyc se caracterizan por contener en su estructura proteica una región conservada de aproximadamente 250 aminoácidos, llamada corazón (*core*) de la ciclina, dividida en dos dominios: el ciclina-N y el ciclina-C. El dominio N, de cerca de 100 aminoácidos, contiene la región de unión con la CDK (*cyclin box*) y es el dominio que define el tipo de ciclina (Wang y col. 2004). El dominio C es el menos conservado y está presente en la mayoría pero no en todas las ciclinas, por lo cual no parece ser un dominio crucial para su función (Horne y col. 1996). Además poseen la secuencia prolina, glutamato/aspartato, serina/treonina (PEST) en el C terminal, considerada marcador de proteínas de corta vida media (Buendía-Monreal y col. 2011).

A las ciclinas se las clasifica en tres grupos (I, II y III) donde las del grupo I constituyen proteínas claves en la división celular. De los genomas secuenciados de plantas se identificaron y caracterizaron ciclinas a gran escala, y se las clasificó de acuerdo a sus similitudes estructurales con las ciclinas animales en tipo A, B, C, D, H y L, no se encontraron ciclinas tipo E (Barroco y col. 2003, Wang y col. 2004). Por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se identificaron 49 ciclinas categorizadas en 10 familias (Wang y col. 2004), particularmente 10 se corresponden a CycA, 11 a CycB y 10 a CycD (Komaki y Sugimoto 2012). En el genoma de *Oryza sativa* L. (arroz) 49 ciclinas conforman nueve familias (La y col. 2006), mientras que en el de *Zea mays* L. (maíz) se reportaron 59 genes agrupados

según los dominios proteicos en seis tipos (Hu y col. 2010). En *Triticum aestivum* L. (trigo) sólo se ha caracterizado un ortólogo putativo de la CycD2 de *Arabidopsis* (Wang y col. 2006), pero se carece aún de la información acerca del número de genes presentes en el genoma.

La combinación entre las diferentes CDK y los distintos tipos de Cyc provee una estrategia de reconocimiento de diferentes sustratos y promoción de distintas fases del ciclo. Dependiendo de su similitud estructural y sus patrones de acumulación periódica se las agrupa en: ciclinas específicas de G1 (tipos C y D, E también en animales) y ciclinas mitóticas (tipo A y B) (Ma y col. 2013).

Por ejemplo, la kinasa dependiente de ciclina clase A (CDKA) es esencial para el ingreso al ciclo de células en G0 y para la transición de G1 a S y de G2 a M. Constituye la familia más grande de las CDK, contando con 48 miembros. Desde el punto de vista de su unión a ciclinas se caracteriza por el motivo de reconocimiento PSTAIRE (Tank y Thaker 2011). Tres son las ciclinas capaces de regular positivamente la actividad de CDKA: tipo A (CycA), tipo B (CycB) y tipo D (CycD), y en cada caso los complejos resultantes modulan diferentes transiciones en el ciclo celular. El pasaje de G1 a S está gobernado por el complejo CDKA;1/CycDs y la progresión a través de la fase S por CDKA;1/CycA3. La transición G2 a M es gobernada por el complejo CDKB;1/CycA y CycB.

Las CycD son limitantes en la activación la transición G1-S y su expresión se encuentra bajo el control de señales intrínsecas y extrínsecas. Son consideradas sensores de las condiciones externas y se expresan fundamentalmente en tejidos en proliferación (Buendía-Monreal y col. 2011).

Las CycD mantienen a la célula en un estado de división relacionado con la vía Rb-E2F, en la cual la proteína inhibitoria relacionada al retinoblastoma (Rb) luego de fosforilarse por CDKA;1-CycD, pierde su afinidad por la familia del factor de transcripción E2F-DP (Boniotti y Gutierrez 2001). En *Arabidopsis thaliana* se describieron tres factores E2F: a, b y c; que forman dímeros con las proteínas DP (*dimerization partner*), donde E2Fa y b son activadores y E2Fc es represor transcripcional. La liberación de E2Fa y b/DP activa la expresión de genes de fase S, necesarios para la replicación y reparación del ADN y mantenimiento de la

cromatina (Ramirez-Parra y col. 2003, Takahashi y col. 2008, Naouar y col. 2009) (Figura 1.2). Algunos genes que contienen secuencias específicas de unión a E2F/DP son, por ejemplo, *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), *mini-chromosome maintenance* (MCM), *ribonucleotide diphosphate reductase* (RDR), *DNA replication licensing factor CDC6a* (CDC6), *origin recognition complex subunit 1* (ORC1), entre otros (Vandepoele y col. 2005).

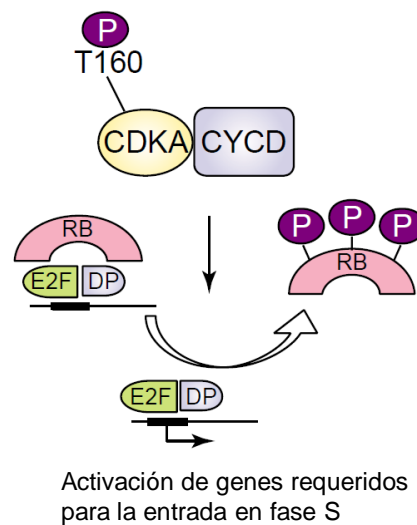


Figura 1.2. Esquema simplificado del mecanismos bioquímico de regulación del factor de transcripción E2F responsable de la transición G1-S del ciclo celular (tomado y adaptado de Stals e Inzé, 2001).

Por otro lado, el complejo CDKA/CycD fosforilaría al represor transcripcional E2Fc/DP catalizando la destrucción vía su complejo con la ligasa E3 (*SCF E3-ubiquitin-protein ligase*) (Inzé y De Veylder 2006).

Los genes que se expresan específicamente durante G2 y M contienen en sus promotores elementos MSA, que es reconocido por factores de transcripción MYB3R. Las ciclinas tipo B se unen específicamente a CDK (CDKA-CDKB) para formar complejos activos que fosforilan MYB3RA, que operan como activador transcripcional desplazando a MYB3RB (represor transcripcional) (Berckmans y De Veylder, 2009).

1.1.1. Sistema ubiquitina-proteasoma

La ubiquitina (Ub) es una pequeña proteína de 76 aminoácidos ubicua en los organismos eucariotas. Su conjugación (unión covalente) a una proteína diana se denomina ubiquitinación, y es reconocida como una modificación postraduccional muy versátil, ya que la posibilidad de que una (monoubiquitinación), algunas o muchas moléculas de Ub (poliubiquitinación) puedan unirse a la proteína blanco genera una diversidad de conformaciones finales que puede ser luego reconocida de manera diferencial por otros componentes celulares (Chen y col. 2011)

La conjugación de las proteínas con Ub requiere de energía (ATP) y la participación secuencial de tres enzimas: la enzima activadora de Ub (E1), la enzima de conjugación con Ub (E2) y la Ub ligasa (E3). Primero la ubiquitina es activada por la enzima E1, luego es conjugada con la E2 y finalmente es transferida a la molécula de proteína sustrato con la asistencia de la E3 ligasa, de forma que la Ub queda unida a una lisina interna de la proteína blanco. La especificidad de la conjugación con Ub está dada por la enzima E3 que reconoce la proteína a modificar. La enzima E3 comprende una familia de proteínas muy diversas, por ejemplo, en el genoma de la planta *Arabidopsis thaliana* se encontraron más de 1.200 genes que codifican diversas E3, mientras que sólo 2 secuencias se relacionan con E1 y 45 con E2 (Santner y Estelle 2010).

La función más caracterizada de la poliubiquitinación es la marcación de una proteína para su degradación por el proteasoma. El 26S proteasoma es un complejo proteico ATP-dependiente responsable de la degradación de las proteínas conjugadas con Ub que además produce la liberación de las moléculas de Ub para su reutilización. Se encuentra formado por la asociación de dos partículas reguladoras conocidas como 19S y una subunidad central catalítica denominada 20S proteasoma. El 20S proteasoma tiene forma de barril y está constituido por cuatro anillos apilados. En el centro del barril hay un canal en el que se encuentran los sitios activos para la degradación de las proteínas. La partícula 19S es la encargada de reconocer los sustratos específicos conjugados con Ub y tiene a su cargo el control del acceso al proteasoma 20S evitando la degradación indiscriminada de proteínas. Se calcula que cerca del 80% de las

proteínas celulares son degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma, lo que hace a esta vía de importancia fundamental como mecanismo subyacente en el control de varios procesos celulares, entre ellos el ciclo celular en eucariotas, el procesamiento de antígenos, la respuesta a hormonas en plantas, entre otros (Kish-Trier y Hill 2013).

La Ub no es el único polipéptido capaz de modificar de manera postraducciona a las proteínas, sino que representa un miembro de una familia de otros modificadores que pueden ser reversiblemente unidos a las proteínas denominados de manera general proteínas similares a las ubiquitinas (Ubls, *Ubiquitin-like proteins*), que como la Ub son un producto de la transcripción génica. Entre ellos se encuentra pequeños modificadores parecidos a la ubiquitina (SUMO, *Small Ubiquitin-Like Modifier*) que sólo comparten un 18% de identidad de secuencia respecto de la ubiquitina, pero contienen el mismo pliegue estructural. Tanto la unión con SUMO (o sumoilación) como la conjugación con otros modificadores proteicos se desarrolla en una serie de pasos similar a la ubiquitinación, y gobiernan procesos que van desde la limpieza celular, el reciclamiento de nutrientes, la regulación transcripcional, la remodelación de la cromatina, el metabolismo del ARN (Vierstra 2012).

1.1.3. Control de la progresión G1-S

Controlar y coordinar los complejos individuales CDK/Cyc es vital para permitir la progresión del ciclo celular. En este sentido, se pueden enumerar tres mecanismos principales. En primer lugar, el control de la síntesis, localización y degradación de las Cyc, en segundo lugar la activación o inhibición del complejo mediante fosforilaciones y defosforilaciones y por último la regulación mediante inhibidores.

La mayoría de las ciclinas tiene un reciclado (*turn over*) muy rápido, son sintetizada y activamente degradadas por el 26S proteasoma. El nivel de transcripción de los genes de las CycD está regulado por las fitohormonas (Buendía-Monreal y col. 2011), mientras que la CycA y la CycB muestran una síntesis regulada con el ciclo, donde su respuesta no parece depender de estímulos

externos (Inzé y De Veylder 2006). La degradación de ciclinas se lleva a cabo por el sistema ubiquitina-proteasoma. Existen dos tipos de E3 ligasas capaces de reconocer Cyc: *Skp-Cullin1-F-Box E3 ligasa* (SCF) y el *anaphase-promoting complex/cyclosome* (APC/C, *Cullin-RING finger E3 ligase*). La E3 SCF regula la transición G1-S mientras que la APC/C es más activa desde la anafase hasta final de G1 durante la mitosis. Recientemente se describió en animales que la sumoilación, regula la localización subcelular de la CycD, aumentando sus niveles funcionales en el núcleo e impidiendo su migración al citoplasma donde es degradada (Wang y col. 2011).

El segundo control radica en la fosforilación/desfosforilación del complejo CDK/Cyc. La fosforilación del extremo N terminal del elemento CDK en los residuos Tyr 15 y Thr 14 (o sus equivalentes) inhibe la actividad del complejo, mientras que la fosforilación en Thr 160 (o su equivalente) lo activa. Las enzimas encargadas de estos procesos son la WEE1 kinasa que fosforila, y la fosfatasa CDC25 encargada de eliminar los fosfatos que inhiben la actividad. La expresión de CDC25 es impulsada por citocininas (Inzé y De Veylder 2006).

El tercer mecanismo de modulación de la actividad CDK/Cyc es la interacción con proteínas inhibitorias que interfiere con la fosforilación de sus sustratos. En plantas se describieron dos familias principales: los inhibidores de kinasa dependiente de ciclina (*CKI/Kip related-protein*, KRP) y las SIAMESE (*SIM/SIAMESE-related SMR*). La proteólisis mediada por el proteasoma es también el mecanismo de control de los inhibidores (Inzé y De Veylder 2006).

Una vez que las células detienen su proliferación y comienzan su diferenciación, frecuentemente ingresan en un proceso del ciclo celular alternativo denominado endoreduplicación o endociclo, en el cual las células replican su ADN sin intervención de la mitosis, incrementando la ploidía y contribuyendo así al crecimiento y desarrollo de varios órganos. Se considera que el endociclo es iniciado por la inactivación del complejo CDK-Cyc (Breuer y col. 2010).

1.2. Mecanismos de control de la expansión celular

Previo a la diferenciación y cuando la división celular cesa, la célula vegetal expande 10 a 100 veces su volumen. La elongación de las células vegetales se encuentra regulada por una combinación entre el ingreso de agua, que genera como consecuencia el incremento en la turgencia, y la deformación plástica de la pared que puede sufrir una célula en crecimiento (Taiz y Zeiger 2010).

El ingreso de agua a una célula vegetal es un proceso pasivo, es decir no existen bombas activas para el agua. La célula en crecimiento puede disminuir el potencial de agua dentro de la misma incrementando los solutos. De esta manera el agua ingresa espontáneamente en respuesta a la diferencia de potencial con el exterior. La diferencia entre una célula en crecimiento de una que no lo está es que, en las primeras, este aumento de turgencia intracelular está acompañado de una reducción en la tensión de la pared celular (Taiz y Zeiger 2010). Esta relajación es llevada a cabo por proteínas encargadas de provocar una pérdida de la rigidez de la pared, entre ellas se encuentran expansinas, xiloglucanos endotransglucosilasas/hidrolasas (XET), metilesterasas (Cosgrove 2005).

Las expansinas son proteínas presentes en la pared celular de aproximadamente 250-270 aminoácidos. Basado en las secuencias genómicas y en el análisis filogenético se reconocen en plantas cuatro subfamilias divergentes designadas como α -expansina (EXPA), β -expansina (EXPB), expansina tipo A (EXLA), expansina tipo B (EXLB). El número de genes para cada familia depende de la especie analizada, en *Arabidopsis thaliana* se documentaron 26 genes para EXPA, 6 EXPB, 3 EXLA y 1 EXLB (Sampedro y Cosgrove 2005). El número de genes de expansinas en un genoma hexaploide como el trigo es mucho mayor. Liu y col. (2007) estimaron que el genoma de trigo contiene más de 95 miembros de la familia de genes de expansinas, de los cuales al menos 30 se corresponden con EXPA.

De acuerdo con la hipótesis de crecimiento ácido, la extrusión de protones que realiza la H^+ -ATPasa acidifica la pared y activa las expansinas. Todavía son inciertas las bases moleculares de la acción de las expansinas sobre la reología de la pared, pero las evidencias indican que las expansinas provocan la deformación

plástica de la pared mediante el debilitamiento de las adhesiones no covalentes (puente de hidrógeno) entres los polisacáridos, pudiendo actuar en la interfase celulosa-hemicelulosa. Son efectivas en cantidades de 1 parte de proteína por cada 500 partes de pared, expresado en peso seco. En un modelo simplificado se puede plantear a la pared celular compuesta de un andamio de microfibrillas de celulosa que están unidas a varios glicanos (como xiloglicanos o xilanos), juntos estos polisacáridos forman una fuerte y flexible red portante basada en puentes de hidrógenos. La extensión de la pared celular entraña movimiento y separación de las microfibrillas de celulosa mediante un proceso de deslizamiento molecular. Las EXPA podrían promover ese movimiento induciendo la disociación local y deslizamiento de los xiloglicanos sobre la superficie de la celulosa, mientras que las EXPB trabajarían sobre diferentes glicanos, tal vez xilano, con un efecto similar (Figura 1.3).

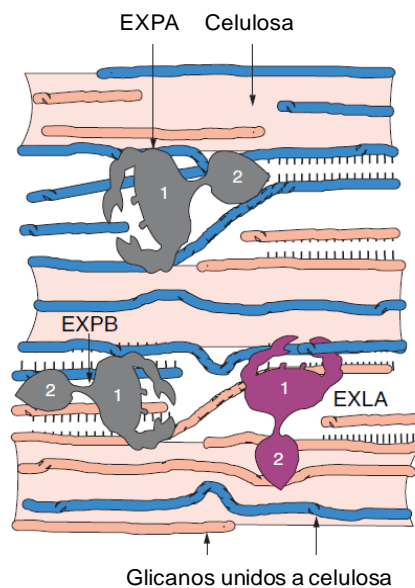


Figura 1.3. Modelo simplificado de la pared celular vegetal y de la acción de las expansinas. 1 y 2 representan los dominios identificados en las proteínas (tomado de Sampedro y Cosgrove, 2005).

Respecto de las proteínas EXLA y EXLB, se predice que son secretadas a la pared celular, pero su actividad no fue aún bien establecida (Sampedro y Cosgrove 2005).

Las enzimas hidrolíticas relacionadas con la pared celular, como las glucanasas e hidrolasas, no son las principales catalizadoras de la expansión de la

pared, pero pueden modular indirectamente el deslizamiento de los polímeros mediados por expansinas (Dyson y col. 2012). Por ejemplo, el tratamiento de las paredes con glucanasas o pectinasas puede estimular la consiguiente respuesta de las expansinas y por lo tanto producir extensión.

El cese de la elongación celular parece ser debido al aumento de la rigidez de la pared celular mediada por el aumento del número de entrecruzamientos. Varias modificaciones de la pared madura pueden contribuir al endurecimiento, entre ellos los polisacáridos de la matriz recién secretada pueden estar alterados en su estructura de manera de formar complejos con la celulosa u otros polímeros de la pared o pueden ser resistentes a las actividades de pérdida de rigidez de la pared, la eliminación de los enlaces mixtos de los β -D-glucanos coinciden con el cese de crecimiento de las paredes, la desesterificación de las pectinas que da lugar a unos geles pépticos más rígidos está asociada también con el cese del crecimiento en la gramíneas y dicotiledóneas, el entrecruzamiento de grupos fenólicos en la pared (como los residuos de tirosina de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) proceso que estaría mediado por la acción de peroxidasa (Taiz y Zeiger 2010).

1.3. Crecimiento y medio ambiente

Las plantas poseen condiciones óptimas de crecimiento relacionadas con la intensidad lumínica (cantidad y calidad), la temperatura, la humedad, la tensión de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes. Cada uno de estos requerimientos se puede modificar según la especie vegetal y su estado de desarrollo (Taiz y Zeiger 2010). En este sentido, cualquier alteración de esta situación óptima o la presencia de factores perjudiciales, como metales o tóxicos, pueden limitar severamente el crecimiento de una planta. Estos disturbios que ocasionan efectos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal son conocidos como factores de estrés abiótico, y entre ellos podemos citar: salinidad, temperaturas extremas, sequía, polutantes ambientales, radiación UVB (Benavides y col. 2000, Costa y col. 2002, Pena y col. 2008). Se ha determinado que muchas de estas condiciones ambientales adversas

para el crecimiento pueden desencadenar un desequilibrio en el estado redox celular (Potters y col. 2010).

2. Homeostasis redox celular

2.1. Especies activas del oxígeno

La molécula de oxígeno es escasamente reactiva, pero su reducción parcial puede producir especies químicamente activas (EAO), entre ellas se encuentra el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ahmad y col. 2008). Por otro lado, algunos procesos cloroplásticos ligados al aumento en la disipación de la energía de excitación pueden producir oxígeno singlete (1O_2), reconocida como otra EAO (Fufezan y col. 2002), como subproducto de la sobreexcitación de la clorofila, Figura 1.4.

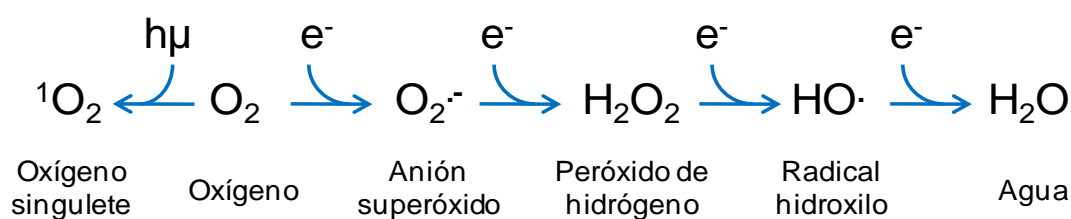


Figura 1.4. Esquema de la activación del O_2 por excitación electrónica y por reducción parcial.

La mayoría de los compartimentos celulares tienen el potencial de convertirse en fuente de EAO (Vranová y col. 2002). Entre las enzimas involucradas en su generación se encuentran las NADPH-oxidasas localizadas en la membrana plasmática, las peroxidasas de pared celular, las oxalato-oxidasas, las amino-oxidasas en el apoplasto, entre otras (Mittler y col. 2004). Por otra parte, durante el transporte normal de electrones en las mitocondrias y en los cloroplastos se produce liberación de electrones al entorno celular, estos electrones pueden reaccionar con el O_2 para producir EAO. Ya que las concentraciones de O_2 son elevadas durante la fotosíntesis, en combinación con intermediarios altamente reactivos, los cloroplastos pueden ser especialmente proclives a generar EAO (Foyer y Mullineaux 1994).

Las EAO se caracterizan por poseer un alto poder oxidante capaz de dañar a moléculas esenciales para la vida como son las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos (Apel y Hirt 2004).

2.1.1. Las especies activas del oxígeno y el daño a macromoléculas

2.1.1.1. Peroxidación lipídica

Las EAO pueden reaccionar transfiriendo electrones a un carbono central generando un radical carbonilo. Los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares son fácilmente oxidables enzimáticamente o por peroxidación autooxidativa⁽¹⁾ mediante una reacción en cadena.

La peroxidación lipídica es definida como el deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados e involucra tres etapas diferentes que incluyen la de iniciación, propagación y terminación.

La etapa de iniciación de la peroxidación lipídica está inducida por radicales libres producidos en los sistemas biológicos. En la etapa de propagación, el oxígeno se adiciona a un radical lipídico (L^{\bullet}) para formar un radical peroxilo (LOO^{\bullet}), una vez iniciado, el LOO^{\bullet} puede propagar la cadena de peroxidación sustrayendo un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado. El lípido hidroperóxido ($LOOH$) puede descomponerse fácilmente en el radical lípido alcóxil (LO^{\bullet}), aldehído (por ejemplo el malondialdehído), alcano, epóxido lipídico y alcoholes (Davies 1995). La etapa de terminación presumiblemente ocurre mediante varias reacciones, incluyendo la acción de antioxidantes.

El efecto de la peroxidación lipídica es una disminución en la fluidez de membrana, aumento de la permeabilidad a sustancias que normalmente no la atraviesan, daños en proteínas de membranas, inactivación de receptores, de enzimas y de canales iónicos (Gill y Tuteja 2010).

¹ (*)El término oxidativa/o ha sido tomado del vocablo inglés “oxidative”, si bien no es una palabra aceptada por la Real Academia Española, es ampliamente utilizada para describir el acto o proceso de oxidación y en ese sentido será utilizada en este trabajo.

2.1.1.2. Oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas involucra la modificación covalente de un polipéptido producido por las EAO directamente o indirectamente por la reacción con productos secundarios del estrés oxidativo (Møller y col. 2007). Las proteínas cumplen funciones vitales en las células, ya sea como catalizadores biológico, regulando la estructura o participando en los procesos de señalización. Por lo tanto, las proteínas dañadas oxidativamente deben ser reparadas o degradadas para no afectar de manera adversa las reacciones celulares.

Una de las modificaciones oxidativas más frecuentes es la formación de derivados carbonilos, proceso denominado carbonilación de proteínas, tanto por acción directa de las EAO, en donde la cadena lateral de aminoácidos como histidina, arginina, lisina, prolina, treonina y triptófano son convertidos en grupos ceto o aldehídos (Møller y col. 2007), como por la vía indirecta formando aductos entre aminoácidos y compuestos conteniendo carbonilos reactivos, como los carbohidratos o los lípidos (Madian y Regnier 2010). La carbonilación de proteínas es considerada una modificación irreversible debido a que las moléculas dañadas no pueden ser reparadas enzimáticamente (Nyström 2005).

Los polipéptidos con aminoácidos azufrados sufren modificaciones oxidativas que incluyen el entrecruzamiento o la formación de derivados, como los grupos sulfénico o sulfóxido (Davies 2005). La oxidación del grupo sulfhidrilo de la cisteína a disulfito es una modificación reversible que puede ser regenerada por el sistema tioredoxina (Trx) o glutaredoxina (Rouhier y col. 2008). Sin embargo, la oxidación a ácido cisteico parece ser un daño irreversible (Ghezzi y Bonetto 2003). La metionina, como la cisteína, es uno de los aminoácidos más fácilmente oxidables debido a la presencia de azufre. El primer estadio de la oxidación genera metionina sulfóxido (MetSO) (Hong y Schöneich 2001). Esta oxidación resulta en la modificación de la actividad y la estructura de las proteínas y puede ser revertida por la presencia en los organismos de la metionina sulfóxido reductasa (MSR). Esta enzima cataliza la reducción dependiente de tiorredoxina/glutarredoxina de la MetSO al residuo Met. Dos tipos de MSR se aislaron, MSRA específica para el MetSO S-enantiómero y MSRB que reduce el

MetSO R-enantiómero. Ambas enzimas son requeridas ya que la oxidación del azufre del residuo metionina en la célula resulta en una mezcla racémica de ambos estereoisómeros (Rouhier y col. 2008).

La carbonilación es un proceso de oxidación que conduce a la pérdida de la funcionalidad de las proteínas y las vuelve inicialmente más susceptibles al ataque proteolítico (Berlett y Stadtman 1997). Las proteínas dañadas oxidativamente pueden sufrir fragmentación química, formar parte de agregados insolubles o de cuerpos de inclusión. La consecuencia del incremento del nivel de enlaces hidrofóbicos, iónicos y covalentes transforma a las proteínas oxidadas en estructuras cada vez más resistentes a la proteólisis (Palma y col. 2002).

2.1.1.3. Daño al ADN

Las modificaciones oxidativas al ADN incluyen: pérdida de bases, formación de dímeros de pirimidina, entrecruzamiento, roturas de hélices, modificaciones de bases como alquilación y oxidación. Si bien se identificaron más de 20 lesiones al ADN producidas por EAO, la formación de 8-oxo-2 deoxiguanosina es una de las más estudiadas (Cooke y col. 2003).

2.1.2. Las EAO y los procesos de señalización

Si bien se describieron a las EAO como subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico, hoy se reconocen como parte central de la compleja red de señalización de las células (Mittler y col. 2011). Sobre todo actúan como reguladores centrales en la fisiología celular y su respuesta al ambiente (Bhattacharjee 2012). Por ejemplo, el H_2O_2 juega un rol dual en plantas, ya que a bajas concentraciones actúa como molécula señal involucrada en la transmisión de información ligada a la aclimatación y así interviniendo en la tolerancia a varios estreses abióticos y bióticos, pero a altas concentraciones activa programas que conducen a la muerte celular, esencial en la respuesta a patógenos (Gough y Cotter 2011).

Si bien durante años se trabajó sobre la idea de que el estrés abiótico genera un estallido oxidativo (*oxidative burst*) que conduce a daños irreversibles en la

célula, al día de hoy se suma la idea de que frente a una situación de estrés se producen olas oxidativas (*oxidative waves*) tanto a nivel celular como de tejido que actuarían como señal (Mittler y col. 2011).

2.2. Sistema de defensa antioxidante

La evolución de los organismos aeróbicos ha dependido del desarrollo de sistemas eficientes para la inactivación de las EAO, éstos incluyen defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Las distintas localizaciones subcelulares del sistema antioxidante, las propiedades bioquímicas de las enzimas que lo componen, la inducción diferencial a nivel de enzima y de expresión génica, y el conjunto de atrapantes no enzimáticos existentes, convierten al sistema antioxidante en una unidad sumamente versátil y flexible que puede controlar la acumulación de EAO tanto temporal como espacialmente (Vranová y col. 2002).

Dentro de la primera línea del sistema de defensa enzimático antioxidante se encuentra la superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1). La SOD es una metaloenzima que se clasifica según su cofactor en Cu/ZnSOD, MnSOD y FeSOD. Está localizada en diferentes compartimentos subcelulares y su función es dismutar el $O_2^{\bullet-}$ para generar H_2O_2 . Las peroxidasas son enzimas encargadas de degradar el H_2O_2 generado y se clasifican según el dador de electrones que utilicen con mayor afinidad. Entre ellas se pueden nombrar a la catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6), la ascorbato peroxidasa (APX) (EC 1.11.1.11), la glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9) y otras peroxidasas inespecíficas. La APX utiliza ácido ascórbico (ASC) generando monodehidroascorbato (MDHA). Se identificaron diferentes isoformas de APX, entre ellas la tilacoidal, la del estroma del cloroplasto, la peroxisomal, la citosólica. El MDHA formado puede dismutar de manera espontánea a ASC y dehidroascórbico (DHA) o ser reducido a ASC a través de la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) (EC 1.6.5.4) en una reacción NADPH dependiente. La glutatión deshidrogenasa (ascorbato) (DHAR) (EC 1.8.5.1) es la enzima encargada de reciclar el DHA a ASC utilizando glutatión reducido (GSH) como fuente de poder reductor. El glutatión oxidado (GSSG) que se genera es

reincorporado al ciclo mediante la actividad de la glutatión reductasa (GR) (EC 1.8.1.7), y el poder reductor del NADPH (Figura 1.5).

Dentro de las defensas antioxidantes no enzimáticas hidrosolubles se incluyen el ascorbato y el glutatión, y en las liposolubles, el α -tocoferol y los β -carotenos.

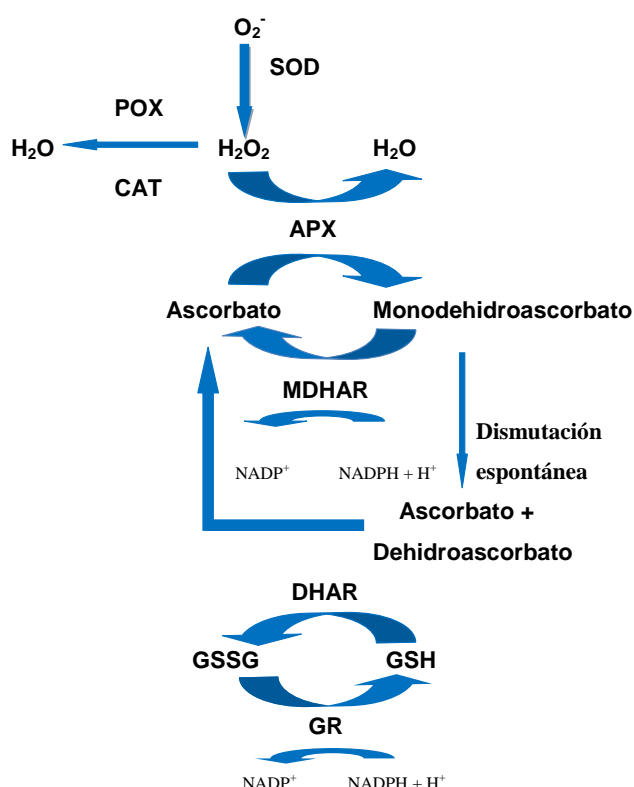


Figura 1.5. Esquema de la vía de desintoxicación de especies activas del oxígeno. Las correspondientes abreviaturas se encuentran incluidas en el texto, POX representa a otras peroxidasa en general.

Otras moléculas de bajo peso molecular como los flavonoides, la prolina, las poliaminas (PA) y los polialcoholes también son reconocidas como participantes en la desintoxicación de EAO (Ahmad y col. 2008). Las poliaminas son moléculas nitrogenadas alifáticas esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas que en los últimos años se han asociado a la defensa antioxidante por presentar propiedades atrapantes de radicales libres y estabilizadoras de la membrana (Groppa y col. 2001, 2003). Además, la homeostasis de las PA se correlaciona con funciones fisiológicas claves, entre las más estudiadas se encuentran la respuesta a diversos tipos de estrés (Groppa y col. 2001, 2003, Mattoo y col. 2006, Groppa y

Benavides 2008, Igarashi y Kashiwagi 2010, Alcázar y col. 2011), la regulación de canales iónicos, la regulación de la expresión génica, entre otras (Groppa y Benavides 2005, Alcázar y col. 2011). Asimismo, el óxido nítrico (NO), una molécula esencial en la señalización de la respuesta al estrés biótico y abiótico, que también ha demostrado tener un rol antioxidante, está relacionado con las poliaminas en su origen biosintético a partir de la arginina y por ser las poliaminas generadoras de NO en sí mismas por mecanismos aún desconocidos (Tun y col. 2006, Rosales y col. 2012).

2.2.1. La catalasa

La catalasa, $\text{H}_2\text{O}_2\text{:H}_2\text{O}_2$ oxidoreductasa, es una hemoproteína tetramérica que cataliza la dismutación de dos moléculas de sustrato idénticas de H_2O_2 a H_2O y O_2 . De modo similar a lo observado en mamíferos, la masa molecular promedio de la proteína nativa en plantas se encuentra entre 250-270 kDa (Ahmad y col. 2008).

En los vegetales la catalasa se localiza en los glioxisomas/peroxisomas, no se estableció la presencia de CAT en otros compartimentos celulares. Aunque se detectó actividad de CAT en el citoplasma, se considera que se debe a una incompleta importación hacia el peroxisoma (Brown y Baker 2008). La función principal de la catalasa es la remoción del H_2O_2 generado durante procesos metabólicos como la β -oxidación de ácidos grasos, la fotorrespiración y el catabolismo de purinas (Mhamdi y col. 2010). En relación al estrés ambiental, se demostró que la actividad de CAT participa activamente en la desintoxicación del H_2O_2 generado por condiciones de desecación (Bailly y col. 2004, Luna y col. 2004), temperatura (Scandalios y col. 2000), radiación ultravioleta B (Willekens y col. 1994), metales (Gallego y col. 1996), entre otras.

No se conoce ningún organismo multicelular que no posea actividad de catalasa (Scandalios 1987). Las plantas se caracterizan por poseer múltiples genes que codifican para las distintas subunidades de CAT, las que a su vez se combinan para formar numerosas isoenzimas. En todas las angiospermas estudiadas hasta la actualidad se encontraron al menos tres genes que codifican para las diferentes subunidades, las cuales poseen secuencias de aminoácidos muy parecidas entre sí,

con una región C-terminal involucrada en la importación del polipéptido hacia el peroxisoma. A modo de ejemplo, al menos seis isoenzimas están presentes en *Arabidopsis thaliana* que se encuentran codificadas por tres genes: dos de ellos localizados en el cromosoma 1 (*cat1* y *cat3*) y uno en el cromosoma 4 (*cat2*) (Frugoli y col. 1996). En maíz tres isoenzimas de CAT están codificadas por tres genes estructurales no relacionados: *cat1*, *cat2* y *cat3* (Guan y Scandalios 2000). En *Helianthus annuus* L. (girasol) se identificaron cuatro genes diferentes (CATA1 a CATA4) cuyos productos se combinan para dar al menos ocho isoformas (Eising y col. 1990). En trigo se reportaron entre una y cinco isoformas en diferentes tejidos (García y col. 2000, Srivalli y Khanna-Chopra 2001, Li y col. 2007) y tres genes: *cat1*, *cat2* y *cat3*, esta última secuencia incorporada recientemente a las bases de datos primarias.

Se determinó que la abundancia de algunos transcritos de CAT se encuentra regulada por controles circadianos, donde la expresión génica estaría modulada por la luz, como se describió para plantas de trigo (Luna y col. 2004), maíz (Acevedo y Scandalios 1991) y *Arabidopsis* (McClung 1997). Las modificaciones oxidativas de las subunidades de CAT también funcionarían regulando los niveles de expresión de sus genes (Azpilicueta y col. 2007, 2008). También se relacionaron cambios en el patrón de expresión de los genes de catalasa con el proceso de germinación y el estadio post-germinativo (Bailly 2004). En plantas de maíz, por ejemplo, se observa un complejo modelo de evolución de *cat1* a *cat2* a lo largo de los distintos estadios de desarrollo (Scandalios 1997). Todo indicaría que la regulación de los niveles de CAT también permitiría modular los niveles del H_2O_2 que interviene en procesos de señalización (Neill y col. 2002, Foyer y Noctor 2005).

2.3. Balance redox y estrés oxidativo

El balance celular entre los niveles de producción de las EAO y la actividad del sistema antioxidante (destrucción de EAO) es crucial tanto para revertir los efectos perjudiciales de estas especies como para permitir por ejemplo el proceso de señalización (Apel y Hirt 2004).

Durante las condiciones óptimas de crecimiento, las EAO se producen en bajos niveles, limitados principalmente a organelas como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Sin embargo, su tasa de producción se eleva durante condiciones de estrés. En este punto, si las células son incapaces de regular eficientemente los niveles de EAO o de eliminar o sustituir de manera adecuada las macromoléculas dañadas por oxidación, se produce el fenómeno conocido como estrés oxidativo, que puede conducir a la disfunción celular.

En la respuesta celular frente a una situación de estrés oxidativo se pueden distinguir tres fases que son dependientes de la concentración de EAO (como se describió previamente para el H_2O_2): bajos niveles de EAO inducen las defensas antioxidantes, una mayor acumulación puede conducir a la activación del programa de muerte celular y muy altas concentraciones producen necrosis celular (Solomon y col. 1999).

3. Condiciones ambientales desfavorables: los metales y la restricción hídrica

En la actualidad, a nivel global, dentro de las modificaciones ambientales más severas a las que están sometidas las plantas se encuentran el incremento en la biosfera de concentraciones tóxicas de metales y el llamado “cambio climático”, ambos derivados de las actividades humanas.

3.1. La contaminación por metales

En condiciones naturales los metales se encuentran en el medio ambiente en formas químicas poco solubles en agua o unidos a las partículas del suelo, lo que hace que, en general, su disponibilidad para los organismos vivos sea baja.

Si bien algunos de los metales se pueden encontrar presentes en concentraciones tóxicas como componentes naturales de la biosfera, la actividad humana es la responsable del aumento de la concentración de los metales en los ambientes en los que ya estaban naturalmente presentes y también de la aparición de otros nuevos para un sitio determinado.

La contaminación ambiental causada por los metales se extendió de la mano de la minería y de las actividades industriales a fines del siglo XIX y principios del siglo XX. Por ejemplo, la producción de cobre, cadmio, níquel, plomo, mercurio y zinc es considerable en las minas de todo el mundo. A nivel de actividades industriales asociadas a fuentes de contaminación se encuentran la fundición de metales y la galvanoplastia y su consecuente generación de efluentes y desechos. En las prácticas agrícolas el incremento de los metales se asocia al uso de fertilizantes y fungicidas de origen natural (por ejemplo, los fosfatos pueden contener diferentes cantidades de cadmio y otros metales, dependiendo del yacimiento mineral a partir del cual se obtuvieron) (Iqbal y col. 2013). También se produce contaminación como resultado de la quema de combustibles fósiles, la urbanización, los residuos domiciliarios, las plantas de tratamiento de aguas residuales, la depuración de lodos, las actividades de navegación y los basurales domésticos (Nriagu 1996).

En suelos de contaminación reciente, el estado químico de los metales es muy variable y la fracción disponible para los organismos vivos depende de la solubilidad y la movilidad de cada metal. Sin embargo, otros factores también pueden afectar la distribución del metal entre la fase sólida (no disponibles) y líquida (disponibles) del suelo como son el tipo y contenido de arcilla y materia orgánica, la acidez, el potencial de óxido-reducción, la temperatura y la salinidad (Basta y col. 2005). Los microorganismos, las plantas y el accionar del hombre también son capaces de modificar la biodisponibilidad de los metales presentes en el suelo, aumentando o restringiendo la liberación de un metal al modificar, por ejemplo, el contenido de materia orgánica o la acidez del suelo.

Uno de los principales riesgos que presentan los metales como agentes contaminantes es su persistencia en el tiempo; además, no pueden ser destruidos y se pueden transferir de un nivel trófico al siguiente, lo que incrementa su concentración a lo largo de la cadena alimentaria (de Vries y col. 2007), fenómeno conocido como bioconcentración o biomagnificación. Un ejemplo de este tipo de mecanismo de concentración se observó en Japón, donde el agua proveniente de una explotación minera fue utilizada para regar campos de arroz, la ingesta del

vegetal por el humano produjo intoxicación crónica con cadmio o enfermedad de Itai-Itai (Foulkes 1986, Ueno y col. 2010).

3.1.1. Los metales y las plantas

Dentro de los elementos esenciales para los organismos vivos, los metales por sus propiedades químicas han cumplido un papel importante en el curso de la evolución. Entre ellas, la de intervenir en reacciones químicas de transferencia de electrones (reacciones de óxido-reducción) dentro de las células, como es el caso del cobre y el hierro, o la posibilidad de formar con otras moléculas compuestos que intervienen en diversos procesos fisiológicos de los organismos. Sin embargo, a pesar de ser necesarios para el crecimiento y el desarrollo de la planta, cuando un metal esencial se encuentra presente en exceso en el suelo la absorción por la planta de cantidades que superan su requerimiento puede resultar dañina.

Por otro lado, aquellos metales presentes en la superficie terrestre que no cumplen funciones biológicas en las plantas son potencialmente tóxicos aún cuando se encuentran en bajas concentraciones, como el cadmio, el mercurio o el plomo, entre otros (Raskin y col. 1994).

3.1.1.2. Las plantas y su propensión natural por los metales

Las plantas desarrollaron mecanismos muy eficientes para adquirir elementos que pueden estar en bajas concentraciones en el suelo. Los metales, junto con el agua y otros nutrientes, son incorporados a las plantas a través de las raíces; ingresan a las células vegetales y se distribuyen en los diferentes compartimentos subcelulares a través de proteínas transportadoras presentes en las membranas de cada compartimento (Hall y Williams 2003).

Una vez dentro de la raíz, la capacidad de un metal para moverse y su sitio de depósito en la planta dependerán de las características del metal, de la especie vegetal y de la edad de la planta en el momento de la exposición. En general, en las raíces se acumula la mayor cantidad, la alta movilidad de muchos metales les permite moverse rápidamente hacia la parte aérea de la planta.

Otra forma de ingreso a la planta es a través de la superficie de las hojas a partir de partículas aéreas provenientes de industrias que emiten Zn, Cd, Cu, Pb, Ni (Foy y col. 1978, Greger y col. 1993).

3.1.1.3. Síntomas de toxicidad producidos por los metales en las plantas

Los principales síntomas visibles en las plantas que crecen en suelos con alta concentración de metales son la disminución del crecimiento y el amarillamiento de las hojas (clorosis) (Figura 1.6).



Figura 1.6. Plantas de girasol de 14 días cultivadas durante los últimos 4 días sin el agregado de metales (Control) o incluyendo 100 μM de HgCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 o CuCl_2 en el medio hidropónico. Se puede observar la disminución de crecimiento visible como un menor tamaño de las hojas en las plantas expuestas a los metales en relación con las plantas control.

Pero las propiedades químicas que vuelven a los metales indispensables para la vida (capacidad redox e interacción con macromoléculas) son las que pueden transformarlos en tóxicos cuando se encuentran en exceso. Frecuentemente la toxicidad es provocada porque interfieren con diversas moléculas (especialmente de proteínas, lípidos y nucleótidos) bloqueando sus grupos funcionales, modificando su conformación o alterando su integridad (Shaw 1990, Clemens 2006). Por ejemplo, a nivel de enzimas se pueden unir a ligandos funcionales (principalmente grupos sulfhidrilos) involucrados en la acción catalítica o

afectando la integridad estructural de la enzima, como fue demostrado para las proteínas encargadas de la biosíntesis de la molécula de clorofila, la ácido δ -aminolevulínico dehidratasa y la protoclorofilida reductasa (Van Assche y Clijsters, 1990). A este mecanismo se puede sumar el de sustituir el metal esencial en metaloproteínas e inducir una deficiencia, este efecto fue observado para varias de las enzimas como las involucradas en la fijación fotosintética de CO_2 , entre ellas la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxidasa (RubisCo) (Van Assche y Clijsters, 1990). Por otra parte, como efectos directos o indirectos sobre las macromoléculas, los metales pueden alterar la permeabilidad de la membrana plasmática conduciendo a la pérdida de electrolitos y otros solutos (Iannone y col. 2010).

Otro efecto involucrado en la toxicidad de los metales es la producción de estrés oxidativo. Los metales pueden conducir al incremento de los niveles de EAO a través de diferentes mecanismos que dependen del elemento que se trate. Por ejemplo, los cationes metálicos Cd^{2+} y Pb^{2+} no experimentan cambios redox y por lo tanto no actúan directamente en la generación de EAO (Pinto y col. 2003). Sin embargo, pueden actuar como prooxidantes a través de la reducción del contenido de GSH, el cual es necesario para la síntesis de fitoquelatinas, y esto disminuye la disponibilidad de este compuesto para la defensa antioxidante (Gallego y col. 2005), alteran las defensas antioxidantes y producen daño a biomoléculas, tanto en exposiciones agudas como crónicas (Gallego y col. 2012).

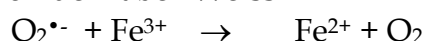
Los metales capaces de modificar su estado de oxidación como el hierro y el cobre ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ o $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$) pueden participar en las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Esquema 1) que resultan en la formación del radical hidroxilo.

Esquema 1.

Reacción de Fenton



Reacción de Haber-Weiss



3.1.2. El cadmio

En las plantas superiores se desconoce que el cadmio intervenga en algún proceso celular, por lo tanto no se lo considera un elemento esencial para estos organismos, más aún, se lo incluye dentro de los elementos tóxicos para la mayoría de los seres vivos.

Se lo encuentra en forma natural en la corteza terrestre; usualmente no se presenta en su estado metálico, sino como mineral combinado con otros elementos como oxígeno (óxido de cadmio), cloro (cloruro de cadmio) o azufre (sulfato de cadmio). La mayoría de estas sales son solubles en agua y por lo tanto se pueden encontrar biodisponibles en bajas concentraciones en el medio ambiente.

La concentración promedio de Cd en la corteza terrestre es de 0,15 ppm dependiendo del material parental. En suelos derivados de rocas ígneas el contenido puede variar de 0,1 a 0,3 ppm; en suelos derivados de rocas metamórficas y sedimentarias oscila entre 0,1-10 ppm y 0,3-11 ppm, respectivamente. Como el Cd está usualmente asociado a vetas de Zn, Pb-Zn y Pb-Zn-Cu, el contenido de Cd en estas áreas mineras puede ser varias veces superior que el promedio del suelo.

La actividad humana es el principal factor que eleva los niveles de Cd en el medio ambiente, ya que se extrae durante la producción de otros metales como zinc, plomo o cobre y tiene numerosos usos industriales, entre ellos se encuentran la fabricación de baterías, la elaboración de pigmentos y de estabilizadores de plásticos (Benavides y col. 2005). La contaminación se genera por emisión de industrias metalúrgicas y refinerías (Zn, Pb, Cu), a lo largo de rutas muy transitadas, también está presente en fertilizantes fosforados (9-130 ppm), lo cual puede originar una contaminación de 1 a 100 g Cd ha⁻¹.

Debido a su elevada toxicidad y a su gran solubilidad en agua, se ha reconocido al cadmio como un polutante significativo que puede ser transferido a la cadena alimentaria y causar genotoxicidad y ecotoxicidad en animales. La ingesta de plantas contaminadas por el metal es la principal fuente de contaminación por cadmio en humanos, además de la inhalación en los fumadores (ATSDR, 2005).

3.1.2.1. Forma de ingreso, transporte y acumulación del cadmio en plantas

Por ser un metal no esencial para las plantas superiores, se asume que no existen mecanismos de entrada a la célula específicos para el mismo. Se realizaron distintos estudios que señalan que entre las proteínas involucradas en el ingreso de cadmio a la célula se encuentran el transportador específico de calcio (LCT1), la proteína ZIP-IRT1 (*zinc regulated transporter/iron-regulated transporter-like protein 1*), la familia de transportadores Nramp (*Natural resistance and macrophage protein*), P1B-ATPases (también conocida como HMAs, *heavy metal transporting ATPases*), la proteína YSL (*Yellow-Stripe 1-Like*) que pertenece a la superfamilia de los OPT (*oligopeptide transporters*) (Gallego y col. 2012).

Una vez dentro de la célula la concentración de cadmio libre es restringida por un mecanismo recurrente en plantas y otros organismos: la quelación del metal por un ligando y en algunos casos la compartimentación del complejo resultante. Este fenómeno previene la circulación de cadmio en el citosol y lo mantiene dentro de un área limitada, unido a grupos funcionales de macromoléculas portadoras de N o de S y ligandos de bajo peso molecular, que están presentes en forma constitutiva, o bien se sintetizan en respuesta al metal (Benavides y col. 2005).

Entre los ligandos de metales reconocidos en plantas se encuentran los ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos y polipéptidos. Dentro de estos últimos, los que fueron mejor caracterizados en relación a la quelación y el secuestro de metales pesados son las metalotioneínas (MT), pequeños polipéptidos ricos en cisteína codificados genéticamente, y las fitoquelatinas, igualmente ricas en cisteína que en contraste con las MT son sintetizadas en forma enzimática a partir del tripéptido glutatión (Gallego y col. 2012).

En la planta, el cadmio se acumula preferentemente en la raíz, secuestrado en las vacuolas y sólo una pequeña proporción es transportada a la parte aérea, concentrándose en orden decreciente en tallos, hojas, frutos y semillas (Chan y Hale 2004). La actividad de la vía de secuestro en las células de la raíz determinará la velocidad de movimiento del metal a la parte aérea de la planta. La cantidad de

cadmio acumulada en raíces o dirigida hacia las hojas difiere considerablemente entre las especies (Rodríguez-Serrano y col. 2006, Pritsa y col. 2008).

3.1.2.2. Toxicidad en la planta

Dentro de los síntomas principales de intoxicación por cadmio se encuentran la detención del crecimiento y la clorosis. A nivel celular se observa incremento en la lignificación de la pared celular, alteración en la ultraestructura del cloroplasto, reducción de la conductancia estomática y de la transpiración foliar (Souza y col. 2011). Se demostró que el cadmio inactiva enzimas involucradas en la fijación de CO₂ (Perfus-Barbeoch y col. 2002), aumenta la proteólisis (Pena y col. 2007), altera el metabolismo del nitrógeno y del azufre (García y col. 2006, Gill y Tuteja 2011), entre otras alteraciones metabólicas. Además, es un destacado productor de daño oxidativo en plantas (Gallego y col. 2012).

3.1.3. El cobre

Para los organismos vivos el cobre constituye uno de los elementos esenciales, participa como elemento estructural en proteínas regulatorias, es un cofactor común de muchas enzimas, incluyendo superóxido dismutasa, citocromo c oxidasa, lacasas, polifenoloxidasas, peroxidasas, plastocianina. Interviene en el transporte fotosintético de electrones, en la respiración mitocondrial, en el metabolismo de la pared celular vegetal y en la señalización por hormonas (Yruela 2005).

Es un elemento de transición ampliamente distribuido en la naturaleza, donde su concentración promedio es de 80 ppm. Esta concentración en el suelo se ve afectada por un gran número de procesos relacionados con la variabilidad espacial natural (geoquímica), pudiendo alcanzar niveles tóxicos naturalmente en algunos suelos. También se puede registrar alto nivel de cobre en el medio ambiente como resultado de la liberación causada por las actividades humanas, en el caso de los suelos agronómicos, este incremento se observa en lugares que recibieron por mucho tiempo aplicaciones de fungicidas a base de cobre o ciertos fertilizantes minerales (Heijerick y col. 2006).

3.1.3.1. Forma de ingreso, transporte y acumulación del cobre en plantas

Una familia conservada de proteínas de transporte de Cu de alta afinidad, la CTR, media la adquisición de este metal en células eucariotas (Puig y Thiele 2002). Dentro de esta familia, los transportadores COPT1-5 poseen alta especificidad por Cu^+ . Debido a que el cobre no sería ingresado primariamente como Cu^{2+} , es posible que sea reducido en la membrana plasmática por FRO2, una hierro quelato reductasa. Otras proteínas asociadas al movimiento de Cu^+ incluyen transportadores *P-type ATPases*, entre ellas RAN1, PAA1, PAA2, HMA5 y HMA1 (Yruela 2005).

En el citoplasma de las células eucariotas no se encuentran iones Cu^+ libres, son las metalochaperonas las encargadas de transportar el metal dentro de la célula y entregarlo a las proteínas blanco específicas. Entre las metalochaperonas que interaccionan con el Cu^+ se describieron ATX1, CCH, CCS1 y COX17. Como para muchos de los metales, la vacuola no sólo es el mayor sitio para el almacenamiento provisional del cobre para su removilización cuando lo demanda la nutrición de la planta, sino que también es la encargada de almacenar el exceso de metal para evitar su acción tóxica (Puig y Penarrubia 2009).

3.1.3.2 Toxicidad en la planta

A concentraciones mayores que las requeridas para un óptimo crecimiento, el cobre tiene una acción tóxica a nivel de las reacciones primarias de la fotosíntesis y sobre la respiración. La disminución de la actividad fotoquímica se encuentra acompañada de la alteración de la estructura y composición de la membrana del tilacoide, reducción de los pigmentos plastídicos, una modificación en la composición polipeptídica y acil-lipídica, destrucción peroxidativa de las membranas cloroplásticas (Uribe y Stark 1982, Maksymiec 1997).

A nivel celular, la toxicidad deriva de su unión a grupos sulfhidrilos de proteínas, inhibiendo la actividad enzimática o la función proteica, induciendo la deficiencia de otros iones esenciales o dañando procesos de transporte celular. El ciclo redox entre el Cu^{2+} y el Cu^+ puede catalizar al producción de EAO con el subsecuente daño a biomoléculas (Yruela 2005).

3.2. La restricción hídrica

3.2.1. Contexto mundial

En el informe del año 2007, publicado por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC), galardonado con el Premio Nóbel de la Paz de ese mismo año se establece, entre otras cosas, que el calentamiento del sistema climático es inequívoco, como evidencia el aumento de la temperatura promedio mundial del aire y del océano, el derretimiento generalizado de nieves y hielos, y el aumento del nivel promedio mundial del mar.

El calentamiento terrestre causado por las actividades humanas de los tres últimos decenios ha ejercido probablemente una influencia notable a escala mundial sobre los cambios observados en numerosos sistemas físicos y biológicos. Sin embargo, predecir escenarios climáticos futuros no es una ciencia exacta debido a la complejidad y el desconocimiento de los procesos atmosféricos. Los modelos de predicción climática más confiables remarcen una serie de cambios a nivel global entre los cuales podemos destacar aumentos de la temperatura y modificaciones en la concentración atmosférica de dióxido de carbono, en la radiación fotosintéticamente activa y en los patrones de lluvias, entre otras variables.

En cuanto al suelo, se prevé aumento en los niveles de erosión eólica e hídrica, incremento en la salinidad de los suelos por uso excesivo del riego y por déficit en los sistemas de drenaje. En algunas zonas es esperable una creciente escasez de agua para riego debido a la reducción de los acuíferos y a la creciente urbanización.

Los incrementos en la desertificación, el descenso de la humedad atmosférica, el aumento en las temperaturas medias y temperaturas máximas, los cambios en las concentraciones de CO₂ y en las radiaciones fotosintéticamente activas, llevan a que las investigaciones sobre las respuestas de la planta ante la restricción hídrica se vayan tornando muy importantes, especialmente cuando se sabe que la agricultura es el principal destino del agua en muchas partes del mundo.

3.2.2. Contenido de agua del suelo

El suelo es un sistema constituido por tres fases (Cosentino 2007). La fase sólida incluye componentes inorgánicos y orgánicos que se agrupan formando agregados y dejando espacios o poros de distintos tamaños. En estos poros se encuentran la fase líquida y la gaseosa en distintas proporciones, cuya variación depende del contenido de agua de un suelo en un momento determinado.

El suelo ejerce una fuerza de retención sobre el agua que contiene, por lo tanto, el comportamiento del agua en el suelo dependerá entonces de las propiedades físicas de éste, ligadas a dos nociones fundamentales como son la granulometría (textura) y la forma de organización de estos elementos en agregados y espacios porosos (estructura).

La textura expresa la proporción relativa de las distintas partículas minerales inferiores a 2 mm. Tradicionalmente estas partículas se dividen según su tamaño de mayor a menor en arena, limo y arcilla; dando por resultado suelos arenosos, limosos, arcillosos o francos de acuerdo a las proporción de cada partícula.

La estructura es la relación entre tamaño, forma y disposición de los poros y agregados (Palma 2007). El sistema poroso del suelo incluye los poros dentro de los agregados así como el espacio poroso continuo entre los agregados. El tamaño y continuidad de los poros son importantes para el movimiento y la retención del agua. Los poros grandes transportan el agua, los medianos retienen agua disponible para las plantas y los poros pequeños retienen agua no disponible para las plantas (Ratto 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación funcional de los poros del suelo

Diámetro partícula primaria (µm)	Diámetro poro (µm)	Succión (MPa)	Función
>1000	>100	<0,003	Aireación, drenaje rápido
250-1000	25-100	0,01-0,003	Conducción y aireación
2-250	0,2-25	1,5-0,01	Almacenamiento agua disponible
<2	<0,02	>1,5	Agua no disponible

3.2.3. Caracterización energética: Potencial agua

Al igual que en otros cuerpos de la naturaleza, el agua en el suelo puede contener energía en distintas formas y cantidades. Dos son las formas principales de energía: la cinética y la potencial. La energía cinética está relacionada con el movimiento, que para el caso del agua del suelo no saturado es despreciable, ya que es lento. La energía potencial del agua en el suelo responde a una condición interna de posición, y es de fundamental importancia para determinar el estado y su movimiento en el mismo (Boyer 1995)

El término potencial químico (μ), según Gibbs (1931), establece el trabajo que es capaz de realizar un mol de moléculas, donde este trabajo es determinado por comparación entre el potencial químico del sistema en cuestión con el potencial químico de un sistema de referencia. En el caso del suelo, según la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo, se utiliza como referencia al agua pura a la misma temperatura que el agua del sistema considerado y a la presión atmosférica normal.

Considerando como cero (0) al potencial químico del agua pura (μ_0) y como μ_w al potencial químico del sistema agua cuando el sistema no es agua pura, μ_w es menor que μ_0 , entonces la comparación entre ambos ($\mu_w - \mu_0$) será negativa. Slatyer y Taylor (1960) nombraron este potencial agua como Ψ_w , expresado en unidades de presión para poder ser utilizado más fácilmente en plantas y en suelo; dividiendo por el volumen parcial molar del agua (V_w), expresado en MPa.

$$\Psi_w = (\mu_w - \mu_0) V_w^{-1}$$

El Ψ_w varía en un amplio rango y la diferencia que existe entre dos puntos provoca el movimiento, que se realiza en forma espontánea desde los lugares de mayor a menor potencial con el fin de alcanzar el equilibrio.

El potencial total de agua del suelo (Ψ_t) incluye al potencial químico y al potencial de campos de fuerzas externas (Ratto 2007). A campo, la única fuerza que influye es la gravitatoria, por lo tanto el potencial gravitatorio (Ψ_g) es la cantidad de trabajo a realizar para transportar agua desde el sistema de referencia hasta otro a cierta altura especificada, por encima o por debajo (negativo o positivo). El potencial total estará definido por:

$$\Psi_t = \Psi_w + \Psi_g$$

Por su parte, el Ψ_w es la sumatoria de los distintos componentes que lo determinan: el potencial mátrico (Ψ_m), el potencial osmótico o de solutos (Ψ_o) y el potencial de presión (Ψ_p).

$$\Psi_w = \Psi_m + \Psi_o + \Psi_p$$

El Ψ_m está asociado a la matriz sólida del suelo, incluyendo a las fuerzas de adsorción, capilaridad y las interfases curvas agua-aire. Su signo es negativo ya que su potencial es menor al agua pura y su valor depende de las características de textura y estructura del suelo.

El Ψ_o resulta del efecto combinado de todos los solutos presentes en la solución del suelo. También disminuye el potencial hídrico al dejar menos moléculas de agua disponibles para realizar trabajo.

El Ψ_p es la resultante de una diferencia neta de presión en relación a la condición de referencia, tal como resulta de la presión hidráulica de un suelo saturado. En un sistema abierto a la atmósfera como es el suelo no existen diferencias de presión. Termodinámicamente representa a la cantidad de trabajo que una unidad de cantidad de agua en un sistema suelo-agua en equilibrio es capaz de realizar cuando se mueve a otro sistema en equilibrio idéntico al anterior en todo sentido, excepto que está a la presión de referencia.

En consecuencia de lo anterior surge que

$$\Psi_t = \Psi_m + \Psi_o + \Psi_p + \Psi_g$$

Donde $\Psi_m + \Psi_o$ da idea de la fuerza de retención que ejerce el suelo sobre el agua y que condiciona la posibilidad de absorción por el vegetal. La suma de Ψ_p y Ψ_g se denomina potencial hidráulico y tiene valor cuando el suelo se encuentra saturado.

3.2.4. Relación agua-suelo-planta-atmósfera

En la mayoría de las plantas las raíces toman el agua de la zona insaturada del suelo ya que requieren un adecuado suministro de oxígeno del aire del suelo. En esta zona, se puede considerar al conjunto suelo-planta-atmósfera como un sistema físico uniforme en el que varios procesos ocurren independientemente

como eslabones de una cadena. Este sistema fue denominado Continuo Suelo Planta Atmósfera (CSPA) (Hillel 1990). En este continuo, el agua fluye desde los sitios con alta energía potencial hacia otros de menor energía. Los cambios en energía potencial a lo largo de este recorrido son proporcionales a las resistencias al flujo que deben soportar, siendo mayor en el suelo que en la planta y aún superior en la transmisión desde las hojas a la atmósfera donde el agua cambia su estado líquido a vapor. La diferencia de potencial entre suelo y atmósfera puede ser de decenas de MPa, y en climas áridos superar los 100 MPa (Ratto 2007).

3.2.5. Potencial agua en la planta

El agua en las plantas se encuentra localizada en dos compartimentos separados por una membrana semipermeable. El compartimento interno o protoplasto, que en conjunto se denomina simplasto y el externo integrado por las paredes celulares y xilema, denominado apoplasto (Taiz y Zeiger 2010).

De la misma manera que en el suelo, el estado hídrico de la planta se puede expresar a través del potencial agua Ψ_w . El potencial agua en el protoplasto celular crea una tensión (presión negativa) en las paredes celulares que arrastra el agua desde el suelo, a través del xilema hacia las células. Existe por lo tanto una continuidad entre la solución del suelo y la de las células de las hojas. En consecuencia, en el protoplasto de las hojas se genera una tensión que se transmite a través del apoplasto hacia la raíz. Y debido a que la solución del suelo absorbida por las raíces no es agua pura, su Ψ_o será negativo.

Los principales componentes del potencial agua en células y tejidos vegetales son los potenciales: solutos (Ψ_o), presión (Ψ_p), mátrico (Ψ_m) y gravedad (Ψ_g)

$$\Psi_w = \Psi_o + \Psi_p + \Psi_m + \Psi_g$$

Los solutos disminuyen el Ψ_w al reducir la tendencia de las moléculas de agua a escapar, de igual manera que la matriz a través de sus efectos de superficie. Presiones externas aplicadas a un líquido incrementan la tendencia del agua a escapar si están por encima de la presión atmosférica, pero la reduce si están por debajo. La gravedad sólo tiene efecto cuando la columna de agua supera un metro,

por lo que en este caso se desprecia. Por lo tanto cada término puede ser positivo o negativo, de acuerdo a si incrementa o disminuye el potencial agua.

El Ψ_w en plantas es generalmente negativo debido a que Ψ_o y Ψ_m son negativos y que Ψ_p no llega a compensarlos. El agua, por lo tanto, se moverá desde Ψ_w menos negativo hacia uno más negativo, este principio utilizarán las plantas para tomar agua desde el suelo.

Por otro lado debemos considerar que la membrana plasmática permite el paso del agua pero restringe el paso de solutos. Esto ocasiona una mayor concentración de solutos dentro del protoplasto y usualmente una presión superior a la atmosférica, denominada turgencia, de modo tal que el

$$\Psi(p) : \Psi_o(p) + \Psi_p(p)$$

en este caso, el potencial mátrico es despreciable (Boyer 1995).

En el apoplasto se encuentra una solución diluida ($\Psi_o(a)$) y no se registra turgencia, pero se verifica presión por los poros y matriz de pared celular ($\Psi_m(a)$), expresada como tensión

$$\Psi_w(a) : \Psi_o(a) + \Psi_m(a)$$

Normalmente los potenciales agua en el interior de la célula son iguales a los de sus paredes celulares, por lo que

$$\Psi_o(p) + \Psi_p(p) = \Psi_o(a) + \Psi_m(a)$$

Esto se puede ver graficado en el diagrama de la Figura 1.7.

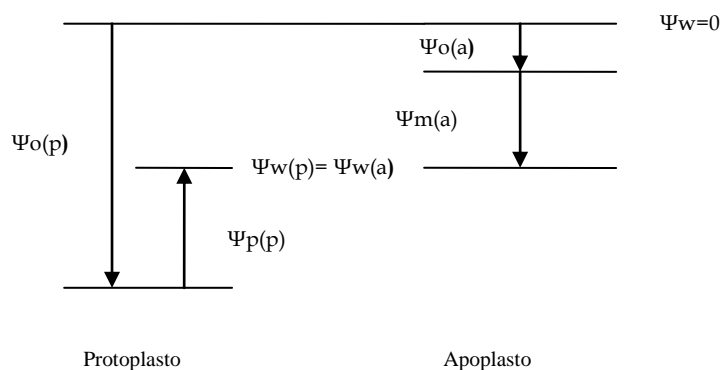


Figura 1.7. Diagrama descriptivo del potencial agua y sus componentes dentro de las células (protoplasto) y en la pared celular y el xilema (apoplasto). La dirección de las flechas indica si el potencial es elevado o disminuido por cada componente (tomado de Boyer 1995)

En las células de las hojas se genera un descenso del potencial debido a la transpiración. Esto genera una tensión en el xilema que cuando es suficientemente grande debido al CSPA provoca que el agua se mueva desde el suelo hacia el interior de la planta. Cuando la tasa de evaporación iguala a la de ingreso, el potencial agua permanece constante. Cualquier factor que altere este equilibrio alterará el potencial de agua de la célula.

3.2.6. Factores abióticos que alteran el estado hídrico de la planta

Varios factores de estrés abiótico están entrelazados por el hecho de que causan ruptura en el estado hídrico de la planta y en general se denomina a este fenómeno estrés hídrico. Entre ellos se pueden citar: sequía, salinidad y congelamiento (Verslues y col. 2006). Esta menor disponibilidad de agua es reconocida por las células vegetales como una disminución en el Ψ_w del suelo (Kramer y Boyer 1995).

3.2.7. Estrategias de las plantas para contrarrestar el déficit hídrico

Las plantas pueden hacer frente a la restricción de agua reprogramando su actividad metabólica y afectando su crecimiento normal (Claeys e Inzé 2013). Clásicamente se reconocen tres estrategias para enfrentar la restricción hídrica, las cuales no son mutuamente excluyentes, conocidas como escapar, evitar y tolerar (Turner 1986).

La estrategia de escape incluye completar el ciclo de vida, asegurando el éxito reproductivo antes que ocurra el déficit hídrico. El éxito reproductivo incluye mejorar la partición de asimilados hacia los frutos en desarrollo y órganos de reserva, que se incrementa en plantas bajo estrés hídrico (Chaves y col. 2003).

Cuando se produce un estrés hídrico moderado, la planta tratará de evitar que el descenso en el Ψ_w llegue a los tejidos, a través de mecanismos que equilibren el ingreso y pérdida de agua. Esencialmente, el estrés es mantenido fuera de los tejidos. Si esto no puede ser logrado debido a un estrés más severo, los tejidos de la planta experimentarán un descenso en su Ψ_w y la planta deberá emplear otros mecanismos para asegurar sus funciones. El estrés ahora se

internaliza hacia los tejidos. La respuesta podrá ser evitar la deshidratación, manteniendo un alto nivel de contenido de agua a pesar del descenso en el Ψ_w o tolerar la deshidratación de los tejidos.

3.2.7.1. El ajuste osmótico

Los ajustes celulares para evitar la deshidratación bajo restricción hídrica moderada son suficientes para mantener el desempeño de la planta e incluye acumular osmolitos (o solutos compatibles) en los protoplastos y modificar la plasticidad de la pared celular.

Al aumentar la concentración de solutos dentro de la célula se eleva el Ψ_o , permitiendo así el ingreso de agua y el mantenimiento de la turgencia por aumento del Ψ_p . Este proceso de acumulación adicional de solutos, por sobre el preexistente, en respuesta al déficit hídrico que le permite a la célula mantener su contenido de agua y volumen se denomina ajuste osmótico (Chandra Babu y col. 1999). Dentro de los solutos denominados compatibles se encuentran compuestos orgánicos de bajo peso molecular cuya acumulación citoplasmática no interfiere con el metabolismo celular, entre ellos podemos encontrar: carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos (como la prolina), polialcoholes (sorbitol, manitol), aminas cuaternarias (glicinbetaína) (Ashraf y Foolad 2007, Liu y col. 2011). La acumulación de osmolitos compatibles en ciertas células requiere en algunos casos de la activación de vías metabólicas para sintetizarlos en las mismas células, en otros al aumento del nivel se corresponde con el transporte desde otros sitios de producción (Chaves y col. 2003). También se incluyen como osmolitos iones inorgánicos, como el potasio (Osakabe y col. 2013)

Este aumento de solutos compatibles puede, por un lado, evitar la deshidratación al incrementar el potencial osmótico celular y mantener así un mayor contenido de agua, pero por otro lado se les adjudican a algunos osmolitos otros roles, como proteger a las proteínas de membranas y/o regular el estado redox celular (Chaves y col. 2003). Por ejemplo, a las poliaminas, que son aminas alifáticas ampliamente distribuidas en los organismos eucariotas, se las involucra en la estabilización de proteínas y la tolerancia al estrés. Las poliaminas se

postularon como compuestos esenciales en la tolerancia al estrés por deficiencia de agua (Yamaguchi y col. 2007, Bae y col. 2008, Alcázar y col. 2010). Las más abundantes son la putrescina (Put), la espermidina (Spd) y la espermina (Spm). En la mayoría de las especies vegetales la Put es sintetizada a partir de arginina por la arginina decarboxilasa (ADC) y a partir de ornitina mediante la ornitina decarboxilasa (ODC). La Put es el precursor de la Spd y Spm a través de reacciones catalizadas por la espermidina sintasa (SPDS) y la espermina sintasa (SPMS).

3.2.7.2. Otros mecanismos de aclimatación

Dentro de los mecanismos de aclimatación que presentan las células vegetales relacionados con la restricción hídrica se encuentra también modificaciones en la plasticidad de la pared celular que se logra mediante un ajuste de la extensibilidad (ϵ) de la misma. La extensibilidad de la pared está dada por su elasticidad. Cuando la elasticidad es alta, la poca rigidez de la pared provocará que la pérdida de agua produzca como resultado que la célula se contraiga y pueda de esta manera mantener la turgencia. Cuando la elasticidad es baja, la rigidez de la pared dará como resultado que ésta no se contraiga cuando hay un déficit hídrico moderado. Esto provocará un descenso en la turgencia disminuyendo así el Ψ_w evitando en consecuencia futuras pérdidas de agua. El incremento en la rigidez de la pared impedirá futuras expansiones de la célula por lo tanto es una estrategia apta sólo para tejidos maduros que ya no crecen (Verslues y col. 2006).

Por otro lado, evitar la deshidratación involucra tanto minimizar la pérdida de agua como aumentar el ingreso. La disminución de la pérdida de agua se puede realizar a través del cierre estomático, de la reducción de la absorción de luz solar mediante el enrollado de las hojas o por la presencia de una capa densa de tricomas que incremente la reflexión solar, a través de la disminución del tamaño de las hojas y/o la aceleración de su senescencia, o favoreciendo el endurecimiento de la pared celular (Chaves y col. 2003). El ingreso de agua también se maximiza incrementando la relación raíz/vástago (Jacson y col. 2000).

Las respuestas al bajo Ψ_w están controladas por una compleja red de eventos regulatorios. Responden tanto a estímulos externos como la pérdida de turgencia o la reducción del contenido de agua, como estímulos internos, entre ellos la producción de EAO, el censado de azúcares y los estímulos hormonales, que reflejan el estado metabólico y de desarrollo de la planta (Verslues y Zhu 2005). El ABA es uno de los factores regulatorios principales coordinando varios aspectos de la respuesta al bajo Ψ_w , entre ellos regula la conductividad estomática, el crecimiento de la raíz, induce la acumulación de solutos. Además se describieron mecanismos independientes de esta fitohormona, como por ejemplo el que involucra a las proteínas DREB (*Drought Responsive Element Binding*) (Nakashima y col. 2009).

4. El trigo

El trigo es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas (*Poaceae*), tribu: *Triticeas*, genero: *Triticum*, constituida por 16 especies. En la actualidad las especies más difundidas en el mundo son el trigo común o de pan (*Triticum aestivum* L.) y el trigo duro o de fideo (*Triticum turgidum* L. subespecie durum). Ambas especies son relativamente nuevas en comparación con la extraordinaria antigüedad de las especies progenitoras.

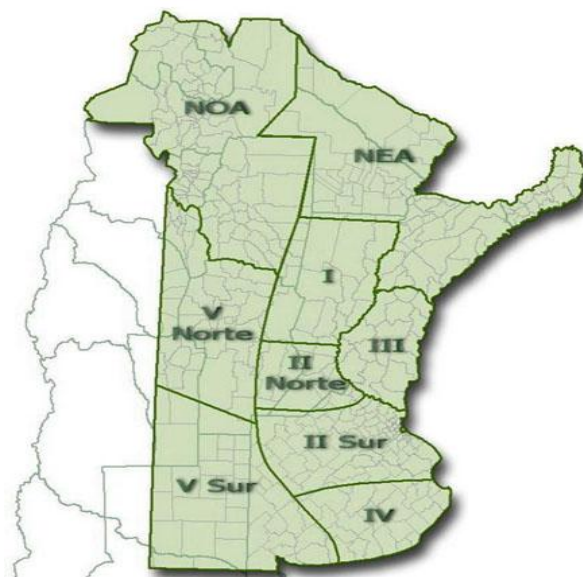
Su gran capacidad de adaptación a las variadas condiciones climáticas convierte al trigo en uno de los cultivos más ampliamente distribuido, con un período de crecimiento corto y un buen rendimiento por unidad de área. Sin embargo, su productividad se ve afectada como consecuencia del deterioro de las condiciones del suelo, la calidad y cantidad de agua disponible y la degradación del medio ambiente en general.

Se asume que el cambio climático impone un régimen hídrico fluctuante en regiones cada vez más extensas del mundo. En Argentina, una considerable proporción de la cosecha de trigo proviene de regiones subhúmedas y semiáridas (Figura 1.8), donde los registros de precipitación varían entre años (variabilidad interanual) y también a lo largo de un mismo año (variabilidad intraanual), y

determinan que los valores promedio, obtenidos de los registros históricos, no permitan realizar una adecuada planificación de cultivos y rotaciones. Por ejemplo, datos obtenidos en la Estación Experimental Agropecuaria INTA situada en Bordenave, con un área de influencia en el SO Bonaerense y SE de La Pampa, donde el trigo permanece como el principal cereal de invierno ocupando una superficie que oscila entre 800.000 y 900.000 hectáreas, indica en su informe 2009 del “Panorama Agroclimático” que la zona atravesó una de las sequías más intensas de las últimas décadas, con un nivel de precipitaciones menor que el esperado durante la mayor parte del año, donde las lluvias acumuladas fueron sólo del 69% del valor normal.

De este modo, el período de implantación y el crecimiento posterior del cultivo ocurre en condiciones de humedad que pueden ir desde subóptimas hasta limitantes. Para continuar creciendo bajo tales condiciones, las plantas deben efectuar ajustes a nivel celular, los que involucran adaptaciones en el ciclo celular y en los mecanismos de señalización bioquímica.

Figura 1.8. Mapa de las regiones productoras de trigo en Argentina. La región triguera típica de Argentina ocupa las provincias de Santa Fe, Entre Ríos, Buenos Aires, Córdoba y La Pampa. Sin embargo, sobre la base de condiciones agroecológicas homogéneas para los requerimientos del cultivo, esta región se ha subdividido en 9 subregiones productivas (tomada de <http://www.bioceressemillas.com.ar/mapa-de-regiones-trigueras/>).



Por otro lado, parte de estas regiones agrícolas se caracterizan por ser deficientes en fósforo (Bosch y da Veiga 2002, Severina 2006). La disminución de la fertilidad de los suelos a causa de la deficiencia de fósforo asimilable es un problema mundial en muchos suelos agrícolas (UNEP 2008-2010), lo cual

incrementó notablemente el uso de fertilizantes fosfatados. López-Camelo y col. (1997) reportaron que el uso de estos fertilizantes produce un incremento en la concentración no sólo de Cd, sino también de Cr, Cu, Zn, Ni y Pb, promoviendo la contaminación de los suelos. La aplicación reiterada de fertilizantes fosfatados incrementa la cantidad de Cd en el suelo afectando los cultivos (Bonomelli y col. 2003). Si bien la industria de los fertilizantes trabaja intentando disminuir el contenido de metales, un dato relevante es que en el suelo persiste al menos el 80% del Cd contenido como impureza de los fertilizantes fosfatados aplicados (Kponblekou y Tabatabai, 1994).

4.1. Sistema radicular de trigo

El sistema radicular del trigo, como el de otras monocotiledóneas, está compuesto por dos subsistemas: el radicular primario y el definitivo. El sistema primario es el que está esbozado en el embrión y comprende en el trigo tres raicillas cuya misión principal es la de anclaje de la plántula durante la germinación (Figura 1.9).

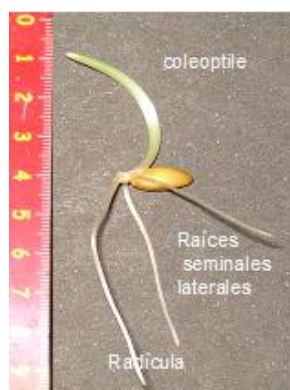


Figura 1.9. Plántula de trigo de 72 h. Se observa el sistema radicular primario, formado por las dos raíces seminales laterales y la radícula central.

El sistema radical definitivo de la planta adulta se forma por encima del lugar de origen de la raíz primaria, en la parte basal del tallo. Cuando éste empieza a ser activo, se atrofia el primario y va desapareciendo. Al sistema radicular definitivo se lo denomina homorrizo, y dado las características del origen de las raíces se las conocen como raíces adventicias, fibrosas o fasciculadas (que crecen en manojos). Estas raíces no presentan crecimiento secundario en grosor.

Capítulo 2

Objetivos e hipótesis

Objetivos e hipótesis de la investigación

En los organismos multicelulares la formación del individuo adulto depende del crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, y de la muerte celular programada. En las plantas superiores el control del crecimiento y desarrollo se lleva a cabo principalmente a través de la regulación del ciclo celular y de la expansión de las células del meristema. Mientras que los animales responden al entorno que los rodea a través de adaptaciones fisiológicas y de su comportamiento que no alteran sustancialmente su plan de desarrollo y diferenciación, las plantas, como organismos sésiles, han desarrollado por un lado, una compleja red de señalización que registra cambios en el medio ambiente y por otro lado, mecanismos para responder a esos cambios que pueden alterar dramáticamente tanto su tasa de crecimiento como la estructura general del individuo.

En virtud de estas consideraciones, el **objetivo general** del presente trabajo es *contribuir a la comprensión acerca de cuáles son los mecanismos involucrados en la modificación de la proliferación y la expansión celular en términos de cambios metabólicos y ajustes bioquímicos que realizan las plantas de trigo sujetas a condiciones ambientales desfavorables.*

Se ha señalado que varios de estos factores ambientales desfavorables para el crecimiento de la planta tienen como uno de sus principales efectos la producción de estrés oxidativo y el ajuste osmótico. A partir del objetivo general y como **objetivos específicos** del presente Plan se examinarán diferentes aspectos relacionados con:

1-las modificaciones del crecimiento, en términos de masa, longitud, tamaño de células, niveles de proteínas y expresión de genes involucrados en el ciclo y la expansión celular.

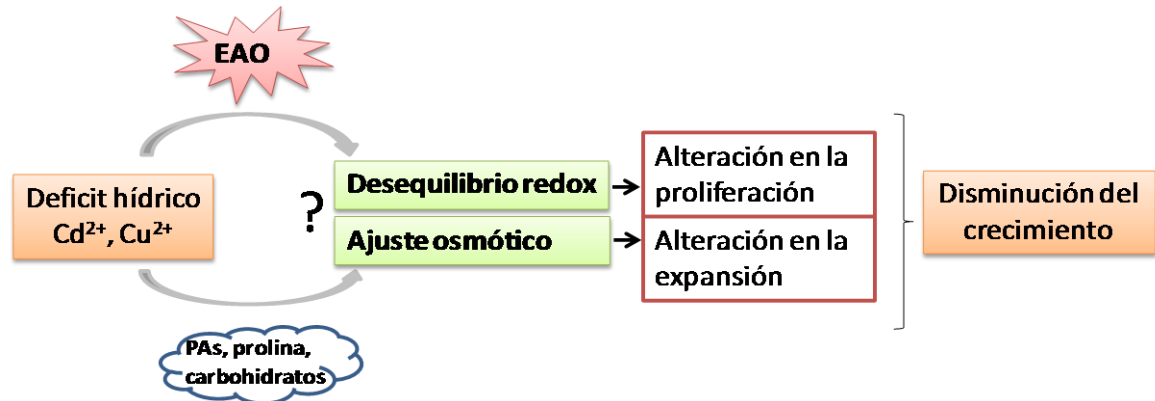
2-el balance redox celular y el ajuste osmótico producido.

3-el comportamiento de la enzima catalasa y otras enzimas antioxidantes

4-el estado de oxidación/ubicuitinación de proteínas que regulan el ciclo celular.

en plántulas de trigo sometidas a tratamientos con cadmio (metal redox inactivo), cobre (metal redox activo), especies oxidantes (como H_2O_2 y metilviológeno, MV) y a restricción hídrica,

La **Hipótesis de trabajo** sobre la que se basa el plan es que las condiciones de estrés generan un desequilibrio redox/ajuste osmótico que condicionan el proceso de proliferación/expansión celular restringiendo el crecimiento.



Esquema representativo de la hipótesis planteada. El signo de interrogación indica el objetivo general a dilucidar durante el desarrollo del presente trabajo.

Capítulo 3

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. Reactivos

Los reactivos utilizados en el desarrollo del presente trabajo se mencionan a continuación con sus abreviaturas, indicando la marca de cada uno de ellos. Todos los solventes, reactivos y las sales inorgánicas utilizadas que no se detallan específicamente fueron de grado analítico.

De *Parafarm*: polietilenglicol 6000 (PEG). *Sigma-Aldrich*: ácido ascórbico (ASC), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico (Mops), ácido sulfosalicílico, acrilamida, 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), agarosa, albúmina de suero bovino, 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), anticuerpo anti-DNP (2,4-dinitrofenol), antrona, bromuro de etidio, butilhidroxitolueno (BHT), catalasa de hígado bovino, Coomassie Brilliant Blue G, Coomassie Brilliant Blue R-250, 3,3'-diaminobencidina (DAB), dihidroetidio (DHE), espermina (Spm), guanidina, metilviológeno (MV), metionina, N'-metilenbis-acrilamida, polivinilpirrolidona (PVP), prolina, putrescina (Put), riboflavina, sal de azul de nitro-tetrazolio (NBT), Sefarosa (4%) activada con bromuro de cianógeno. *Riedel-de Haen*: ácido trifluoroacético (TFA), cloruro de cobre (II) dihidratado, 2-mercaptoetanol. *Kodak*: ácido tricloroacético (TCA), 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNFH), ninhidrina, Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico (Tris-HCl). *BioRad Life Science*: Ready Gel Tris-HCl Gel, 4-15% linear gradient, dodecil-sulfato de sodio (SDS). Los reactivos utilizados en Biología Molecular fueron: TRIzol, inhibidor de Ribonucleasa Rnase Out adquirido en *Invitrogen*; Oligo 18dT de *Biodynamics*; DNasa I de *Promega*; Taq polimerasa, transcriptasa reversa, dNTPs de *Thermo*; Power Plant RNA isolation Kit with DNAase de *MoBio Laboratories*; los iniciadores específicos fueron adquiridos *Sigma-Aldrich*. *Amersham GE*: membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF) *Hybond-P*. El anticuerpo de cabra anti inmunoglobulina de conejo fue adquirido en *DAKO A/S Denmark*, anti-Ub (FL-76), anti-cyclin D1 y anti Cdk2 en *Santa Cruz Biotechnology Inc*. *Merck*: ácido acético glacial, ácido fosfórico, azul de Evans, cloruro de cadmio 2,5 hidrato, cloruro de manganeso, glicerol, metanol, reactivo de Folin, Tritón X-100.

2. Material vegetal

Las semillas de trigo pan cv 75 Aniversario utilizadas para el desarrollo del presente trabajo fueron gentilmente cedidas por la empresa Buck Argentina. También se emplearon los siguientes cultivares: BioInta 105, MT 204, ProInta Elite, cv 9052, BioInta 2004 que fueron cedidas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) estación experimental Marcos Juárez (atención Dr. Marcelo Helguera).

2.1. Modelo de estrés por metales (cadmio y cobre), H_2O_2 y metilviológeno

El material vegetal se obtuvo incubando 15 semillas (previamente desinfectadas superficialmente con una solución 10% v/v de hipoclorito de sodio comercial de 55 g l⁻¹ de cloro activo) en frascos que contenían 30 ml de soluciones de concentración creciente de Cl_2Cd y Cl_2Cu (hasta 100 μM); 0,1, 0,5 y 1 μM de metilviológeno; 0,1 y 1 mM de H_2O_2 (Figura 3.1). Los frascos se incubaron en un agitador rotatorio a 80 rpm, en condiciones de oscuridad y a 24 ± 2 °C. Si bien el trigo puede germinar entre los 4 y los 37 °C, la temperatura óptima para el proceso de germinación se encuentra entre 20 y 25 °C. Luego de 48 h de imbibición, el material vegetal fue lavado con agua destilada, mantenido a 4 °C durante el procesamiento, y utilizado para los correspondientes ensayos.



Figura 3.1. Fotografía del sistema de incubación en frascos.

2.2. Modelo de restricción de agua: condiciones de cultivo y tratamientos

Para la obtención del material vegetal se estableció un sistema de crecimiento en medio líquido colocando 20 semillas en placas de Petri de 10 cm de diámetro que contenían 10 ml de concentraciones crecientes de PEG 6000 preparadas en agua destilada (Figura 3.2), este volumen permite la cobertura necesaria para que la semilla se hidrate, sin cubrirla en su totalidad.



Figura 3.2. Fotografía del sistema de cultivo de plántulas de trigo en placas de Petri.

El agregado del polímero al agua tiene como objetivo disminuir (hacer más negativo) el Ψ_w de la solución o en otras palabras aumentar su Ψ_s . Tomando en cuenta el valor estimado del potencial agua a capacidad de campo⁽³⁾ en un suelo franco, se utilizó -0,03 MPa como potencial agua del control (C) (Schulze y col. 2005). Las concentraciones de PEG y los Ψ_s correspondientes a las soluciones utilizadas se muestran en la Tabla 3.1. Los Ψ_s de cada una de las soluciones fueron corroborados determinando la osmolalidad de las mismas.

³ La capacidad de campo se define como la cantidad de agua retenida por el suelo después de que ha drenado el agua gravitacional y cuando la velocidad del movimiento descendente del agua disminuye sustancialmente. Este valor se obtiene “*in situ*” (a campo).

Tabla 3.1. Potencial osmótico de la solución de PEG 6000 determinada a 24 °C (Michel y Kaufmann 1973).

%(p/v) PEG	Ψ_s (MPa)
3,4	0,03
11,8	0,4
17,6	0,5
22,2	0,6
26,0	0,8
32,4	1,2
40,2	1,8

El medio de incubación fue remplazado con un medio similar a las 48 h de iniciado el tratamiento. Las placas de Petri se mantuvieron a 24 ± 2 °C y en oscuridad. Luego del tiempo de incubación indicado en cada caso las plántulas se lavaron cuidadosamente con agua destilada y se mantuvieron en frío (4 °C) y oscuridad durante el procesamiento del material vegetal.

Para la realización de los ensayos de déficit hídrico las semillas no fueron desinfectadas previamente para evitar alterar su estado hídrico. Cabe destacar que no se observó crecimiento visible de microorganismos en los medios de incubación de las semillas durante los tiempos ensayados.

2.2.1. Ensayo con poliaminas y nitroprusiato de sodio

Para determinar el efecto de las PA en condiciones de estrés hídrico, se usaron dos de las poliaminas más abundantes en organismos eucariotas, la putrescina (Put) y la espermina (Spm), en concentraciones entre 0,001 a 1 mM en el medio de incubación. Las muestras se analizaron luego de tres días de imbibición.

En los ensayos para evaluar el rol del NO se usó nitroprusiato de sodio (SNP) como donador del NO, agregándose al inicio de la imbibición de las semillas en concentración de 100 μ M en el medio. Las semillas se trataron durante 24 y 72hs. En el primer caso se reemplazó el SNP por solución Hoagland control a las 24hs y se continuó el tratamiento hasta las 72hs. En todos los casos las determinaciones de longitud y biomasa se llevaron a cabo a los tres días post-imbibición.

3. Métodos

Para las determinaciones se separaron las tres raíces embrionarias y el coleoptile. En el caso de las evaluaciones donde se utilizó el ápice se obtuvieron segmentos de los 5 mm desde el extremo de las raíces.

3.1. Índice de germinación

El índice de germinación (IG) se expresó como el porcentaje de semillas germinadas a los 4 días (96 h) post imbibición en agua o en los correspondientes medios de incubación respecto de las totales, en base a la siguiente fórmula: $IG(\%) = 100 \cdot SG/ST$, donde SG son las semillas germinadas y ST son las semillas totales. Para el cálculo de IG se consideró como semilla germinada cuando la elongación de la raíz fue ≥ 5 mm. Se estableció como requerimiento que un mínimo de 90% de semillas germinaran en las condiciones control.

3.2. Largo total del coleoptile y de la raíz

El largo total, de la radícula y del coleoptile, se cuantificó mediante el uso de una regla graduada en mm. La velocidad absoluta de elongación (VAE) se determinó con la formula $L2-L1/T2-T1$, siendo L1 y L2 la longitud de la raíz o el coleoptile para los tiempos 1 y 2 respectivamente.

3.3. Determinación de la biomasa

Se determinó el peso fresco (PF) del material vegetal y luego se secó en una estufa a 80°C hasta la obtención de peso constante, considerado el peso seco (PS). En base a las determinaciones de PF y PS se calculó la masa seca relativa (MSR) a partir de la ecuación $(1 - [(PF-PS)/PF]) \times 100$, el contenido de agua (CA) igual a $100 \cdot [(PF-PS)/PF]$ y la velocidad relativa de crecimiento (VRC) = $(\ln PF2 - \ln PF1)/t2 - t1$. En esta última ecuación PF1 y PF2 representan la biomasa correspondiente al tiempo t1 y t2 respectivamente, se calcularon los logaritmos naturales de los peso para cada tejido de cada plántula, y luego sus medias muestrales y desvíos, para un n (tamaño de muestra de cada caso) igual a 40. Se utilizó un intervalo de confianza de 90%.

3.4. Cortes histológicos y estimación del largo de las células

Las raíces fueron fijadas durante toda la noche en FAA (1:4:1 paraformaldehído : etanol : ácido acético glacial) y procesadas mediante la técnica de inclusión en parafina. Las secciones de raíz fueron teñidas con safranina-fast green y montadas con DPX⁽⁴⁾. Los preparados fueron observados en el microscopio y fotografiados, luego las fotos se analizaron utilizando el software Image ProPlus.

3.5. Conductividad

Las raíces y los coleoptiles se colocaron en erlenmeyers (0,5 g de muestra vegetal) que contenían 20 ml de agua destilada. Luego se agitaron levemente y se determinó la conductividad eléctrica del medio (C0). La determinación se repitió luego de incubar el material durante 24 h a 4 °C (C1). Finalmente, los erlenmeyers se autoclavaron (15 min, 0,75 atm) y en el medio filtrado se determinó otra vez la conductividad eléctrica (C2) (Saadalla y col. 1990). A partir de los datos obtenidos se consideró a C2 como el contenido total de electrolitos y se calculó la permeabilidad relativa de la membrana (PRM) a partir de la ecuación $[(C1 - C0) / (C2 - C0)] * 100$.

3.6. Osmolalidad

En similares condiciones a las utilizadas para la determinación de la conductividad eléctrica se midió la osmolalidad del medio (O0) que se corresponde a la osmolalidad del agua, O1 que se corresponde a la medición realizada a las 4 h de incubación y O2 a la realizada luego del autoclavado.

3.7. Cuantificación del contenido de prolina

La determinación del contenido de prolina se realizó según lo descripto por Bates y col. (1973). Los extractos de tejido se prepararon homogeneizando el material vegetal en 3% p/v de ácido sulfosalicílico en una relación de 1 g de

⁴ Servicio técnico realizado en la Cátedra de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

material vegetal en 10 ml de solución de extracción. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante se utilizó para la determinación. A 500 µl de muestra se le agregó 500 µl de reactivo (preparado con 2,5 g de ninhidrina, 60 ml de ácido acético glacial, 40 ml de 6 M de ácido fosfórico) y 500 µl de ácido acético glacial. La reacción se incubó a 100 °C durante 1 h, luego se enfrió en hielo y se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 520 nm. La concentración de prolina se estimó a partir de una curva estándar de prolina.

3.8. Determinación del contenido de hidratos de carbono

La cuantificación de los hidratos de carbono solubles presentes en el material vegetal se realizó mediante el método de la antrona (Yemm y Willis 1954) a partir de 1 g del material vegetal fresco homogeneizado con 30 ml de agua destilada. Luego de centrifugar a 10.000 rpm durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante se utilizó para la determinación.

A una alícuota de 150 µl de la muestra se le agregó 1,5 ml del reactivo de antrona. Se homogeneizaron todas las muestras a temperatura ambiente y luego se llevaron a ebullición durante 15 min. Finalmente, se dejó enfriar a temperatura ambiente en oscuridad y posteriormente (después de 20-30 min) se midió la absorbancia a 620 nm. Simultáneamente con las muestras se realizó la curva de calibración utilizando como patrón glucosa en un rango de 25 a 150 µg ml⁻¹.

El reactivo de antrona se preparó volcando 33 ml de ácido sulfúrico concentrado sobre 17 ml de agua destilada. Sobre ese volumen de ácido se disolvieron 0,5 g de tiourea y 0,03 g de antrona mediante calentamiento en un baño termostatzado entre 80-90 °C.

3.9. Coloración de azul de Evans

Las raíces se sumergieron en 0,25% (p/v) de solución acuosa de azul de Evans durante 20 min a temperatura ambiente y luego se lavaron con agua destilada para remover el exceso de colorante. Después de incubar el tejido en agua destilada toda la noche se cortaron fragmentos de 5 mm de la región apical de la raíz. Para liberar el colorante azul de Evans atrapado en las células, el tejido

se sumergió en solución con 50% (v/v) de metanol, 1% (p/v) de dodecil-sulfato de sodio (SDS) durante 1 h a 50 °C y luego se centrifugó a 3.000 rpm durante 3 min. La densidad óptica del sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 595 nm (Baker y Mock 1994).

3.10. Localización de las especies activas del oxígeno *in situ* en raíces

3.10.1. Tinción con 3,3-diaminobencidina

Las plántulas fueron infiltradas al vacío durante 5 min en una solución 1% (p/v) de 3,3-diaminobencidina (DAB) preparada en solución amortiguadora de pH de 50 mM de fosfato de potasio (pH 6,4), e incubadas a temperatura ambiente durante toda la noche en oscuridad. Para finalizar, se lavaron y transfirieron a etanol 70° y fueron fotografiadas (Romero-Puertas y col. 2002).

3.10.2. Tinción con sal de azul de nitro-tetrazolio

De forma similar a lo realizado en el punto 3.10.1., las plántulas fueron infiltradas al vacío durante 5 min con una solución al 0,1% (p/v) de NBT preparada en solución amortiguadora de pH de 50 mM de fosfato de potasio (pH 6,4), que contenía 10 mM de azida sódica e incubadas luego a temperatura ambiente durante toda la noche en oscuridad. Para finalizar, el tejido se sumergió en etanol 70° y luego fueron fotografiadas (Romero-Puertas y col. 2002).

3.10.3. Tinción con sondas fluorescentes

La presencia de especies activas del oxígeno se determinó en el extremo de la raíz utilizando 25 µM de H₂DCFDA y 10 µM de DHE preparados en 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4) como sondas de H₂O₂/peróxidos y O₂^{•-}, respectivamente (Rodríguez-Serrano 2009).

Luego de 48 h de tratamiento el extremo de la raíz se incubó durante 30 min, a 37 °C en oscuridad con la correspondiente sonda. Donde se lo indica, para verificar si la señal fluorescente era debida a H₂O₂/peróxidos y O₂^{•-}, las raíces fueron incubadas con 1 mM de ASC o 4 mM de Cl₂Mn previo a los tratamientos con H₂DCFDA y DHE, respectivamente. La fluorescencia verde corresponde a la

oxidación de la sonda H₂DCFDA (485 nm excitación, 530 nm emisión) y la roja a la de DHE (490 nm excitación, 520 nm emisión). El tiempo de exposición fue igual para todas las muestras. No se observó autofluorescencia en controles sin teñir.

3.11. Actividad de enzimas antioxidantes

3.11.1. Catalasa

3.11.1.1 Determinación espectrofotométrica

Los extractos para determinar la actividad total de CAT se prepararon homogeneizando el material vegetal en solución amortiguadora de pH (relación 1:10, g de material vegetal: ml de solución de extracción) que contenía 50 mM fosfato de potasio (pH 7,4), 1 mM de EDTA, 1% (p/v) de PVP para remover interferencias de compuestos fenólicos (Loomis 1969) y 0,5% (v/v) de Tritón X-100, a 4 °C. Los homogenatos se centrifugaron a 15.000 rpm durante 20 min a 4 °C. La actividad de CAT se determinó espectrofotométricamente midiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm en un medio de reacción que contenía 50 mM de fosfato de potasio (pH 7,2) y 2 mM de H₂O₂. Se determinó la constante de reacción de pseudo-primer orden (k') de la disminución de la absorbancia del H₂O₂ y el contenido de CAT se calculó usando la constante $k = 4,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k' = k \times [\text{CAT}]$ (Chance y col. 1979).

3.11.1.2. Determinación en geles (zimogramas)

Para determinar la presencia de isoformas de CAT se utilizaron extractos similares a los obtenidos en el ítem 3.11.1.1. Se emplearon geles nativos de poliacrilamida (*native* PAGE) en un sistema anódico discontinuo: 4% (p/v) del gel concentrador y 7,5% (p/v) del gel de resolución respectivamente y de gradiente lineal (4-15%) comercial (Laemmli 1970). En cada calle del gel se sembraron diferentes volúmenes de extracto que contenían un equivalente a 50 µg de proteínas a los que se había agregado 10% (v/v) de glicerol y 0,25% (p/v) de azul de bromofenol. Durante la electroforesis se mantuvo el voltaje constante (170 V) y se utilizó como solución del electrodo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina (pH 8,3). Luego de la electroforesis los geles se lavaron con agua destilada y se incubaron

con 0,003% (v/v) de H₂O₂ (30% [p/v], 100 vol) disuelta en solución amortiguadora de pH de 50 mM de fosfato de potasio (pH 7,0), durante 10 min. Luego de enjuagarse con agua destilada, se incubaron con 1% (p/v) de K₃Fe(CN)₆ y 1% (p/v) de FeCl₃ (Woodbury y col. 1971). Para identificar diferencias en las isoenzimas de CAT se agregó 3-AT a la solución de H₂O₂ en una concentración final de 10 mM (Orendi y col. 2001).

La presencia de isoformas de CAT se evidenció por la aparición de bandas de color amarillo sobre un fondo de color verde. Los geles se fotografiaron con un equipo Fotodyn y se analizaron con el programa GelPro.

3.11.2. Superóxido dismutasa

Los extractos obtenidos de manera similar al utilizado para evaluar actividad de catalasa se usaron para determinar la actividad de SOD. Se utilizó como solución generadora de anión superóxido un medio que contenía 14,3 mM de metionina, 82,5 µM de NBT, 2,2 µM de riboflavina y el volumen apropiado de sobrenadante. Los tubos de reacción fueron colocados a 25 °C e iluminados con tubos fluorescentes, la reacción se inicia y termina al encender y apagar la luz (no hay variaciones detectables de reacción bajo luz ambiente durante la preparación de los reactivos y las medidas espectrofotométricas), la reducción del NBT fue seguida mediante mediciones de la absorbancia a 560 nm cada 2 minutos durante 12 minutos. Soluciones idénticas que no fueron iluminadas se utilizaron como blancos. Una unidad de SOD se define como la cantidad de extracto necesario para inhibir el 50% de la fotorreducción del NBT (Becana y col. 1986).

3.11.3. Ascorbato peroxidasa

La extracción de la enzima se realizó homogeneizando el material vegetal 1:10 p/v con una solución reguladora que contenía 50 mM de fosfato de potasio (pH 8,0), 5 mM de ASC, 1 mM de EDTA y 1% (p/v) de PVP. Se centrifugó 30 min a 15.000 rpm y todo el proceso se realizó a 4 °C. El agregado de ascorbato en la solución de extracción se debe a que la enzima es lábil en ausencia de este compuesto. La actividad enzimática se determinó en el sobrenadante

inmediatamente de obtenido el mismo, como la disminución de la absorbancia a 290 nm debida a la oxidación del ascorbato (coeficiente de extinción = $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 30 °C, en un medio de reacción que contenía: 0,5 mM de ASC, 0,1 mM de H_2O_2 , 50 mM de fosfato de potasio (pH 7,0) y 0,1 mM de EDTA. Una unidad enzimática fue definida como los mmoles de ascorbato oxidado generados por minuto (Nakano y Asada 1981).

3.11.4. Guayacol peroxidasa

La actividad de guayacol peroxidasa (GPX) se estimó en extractos obtenidos de manera similar a los utilizados para la determinación de CAT. El medio de reacción utilizado contenía 50 mM de fosfato de potasio (pH 7,0), 0,1 mM de EDTA, 1 mM de guayacol, 0,1 mM de H_2O_2 . La determinación se realizó a 30 °C. Una unidad de GPX se define como el incremento de la absorbancia a 470 nm debido a la oxidación del sustrato, en μmoles (coeficiente de extinción $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por minuto (Nakano y Asada 1981).

3.12. Proteínas solubles totales

3.12.1. Cuantificación por el método de Bradford

La concentración de proteínas solubles en los extractos se determinó según el método descrito por Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino como estándar. Se realizaron diluciones de los extractos para que contengan entre 10 y 100 μg de proteína por ml. A 100 μl de la dilución de cada alícuota se agregó 1 ml del reactivo de Bradford (0,01% [p/v] de Coomassie Brilliant Blue G; 4,7% [v/v] de etanol y 8,5% [v/v] de ácido fosfórico). Luego de 2 min y antes de 1 h se determinó la absorbancia a 595 nm.

3.12.2. Geles de poliacrilamida

Los extractos proteicos se prepararon homogeneizando 0,5 g de raíz (ápices) en 2,5 ml de 50 mM de fosfato de potasio (pH 7,4) y centrifugado a 15.000 rpm durante 30 min a 4 °C. Alícuotas de extractos con un contenido total de 50 μg de proteína se separaron mediante electroforesis en un sistema anódico discontinuo

de geles de poliacrilamida que contenían SDS (SDS-PAGE), de 10% (p/v) de poliacrilamida en el gel de resolución. Para el desarrollo de la electroforesis se aplicó un potencial eléctrico constante de 170 V, utilizando como solución del electrodo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina (pH 8,3) con 10% (p/v) de SDS. Inmediatamente después, los geles se colocaron para su tinción en 0,1% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 preparado en 10% (v/v) de ácido acético y 40% (v/v) de metanol y se incubaron toda la noche. Luego se decoloraron durante 2 h usando 10% (v/v) de ácido acético y de 40% (v/v) de metanol. Las proteínas se observaron como bandas azules sobre un fondo translúcido. Los geles se fotografiaron con un equipo Fotodyne, y se analizaron con el programa Gel-Pro.

3.13. Determinación del nivel de expresión de ciclina D, CDKA y 20S proteasoma

Los extractos se obtuvieron de manera similar a lo descrito en el punto 3.12.2. Las muestras se diluyeron en alícuotas con un contenido final de 50 µg de proteínas con solución amortiguadora de pH de condiciones desnaturalizantes que contenía 100 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 2% (p/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol y 0,01% (p/v) de azul de bromofenol. Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 4 min y se separaron utilizando SDS-PAGE (Laemmli 1970), con un gel concentrador 4% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida y de resolución 15% (p/v). La electroforesis se desarrolló estableciendo 170 V constante y utilizando como solución del electrodo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina (pH 8,3) con 10% (p/v) de SDS. Igual procedimiento pero en 12,5% (p/v) SDS-PAGE se utilizó para el proteasoma.

Las proteínas del gel se electrotransfirieron a una membrana de PVDF manteniendo la intensidad de corriente constante (250 mA) durante 50 min. La solución de transferencia usada fue 25 mM de Tris y 192 mM de glicina (pH 8,3) con 20% (v/v) de metanol. Luego de la transferencia se realizó el bloqueo de la membrana utilizando 5% (p/v) de leche descremada preparada en 100 mM de fosfato de sodio (pH 7,5) que contenían 100 mM de NaCl (solución PBS) durante 1 h. Tras realizar un lavado con PBS para eliminar el exceso de leche, las membranas

se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios policlonales de conejo correspondientes a *cyclin D1* y *Cdk2* – proteínas altamente relacionadas con la ciclina D y la CDK tipo A de plantas- y 20S proteasoma de maíz (generosamente cedido por el Dr Brouquisse). Luego la membrana se lavó 4 veces en un intervalo total de 1 h con 20 mM de Tris-HCl (pH 7,6) y 136 mM de NaCl (solución TBS) con 0,1% (v/v) de Tween 20. Posteriormente, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y luego se lavó 4 veces con 0,1% (v/v) de Tween 20 en TBS durante 1 h. Las bandas se revelaron utilizando DAB y H₂O₂ como sustratos. Las membranas se fotografiaron y se analizaron con el software Gel-Pro.

En todos los casos, las fotografías de las membranas que se muestran en los resultados son representativas de las obtenidas en al menos 5 ensayos independientes.

3.14. Determinación de proteínas oxidadas

3.14.1. Grupos carbonilo totales

El contenido total de grupos carbonilo se evaluó como parámetro de daño oxidativo a las proteínas mediante la reacción con 2,4 dinitrofenilhidrazina (Levine y col. 1990). Los extractos para las determinaciones se realizaron homogeneizando y luego centrifugando a 15.000 rpm, 1 g de tejido vegetal en 10 ml de 50 mM de fosfato de potasio (pH 7,4) que contenía 120 mM de KCl, 0,1% (v/v) de Tritón X-100 y 0,1 g de PVP. La reacción se llevó a cabo agregando 500 µl de una solución 10 mM de DNPH preparada en 2 N de HCl a 500 µl del extracto, e incubando durante 1 h a temperatura ambiente y agitando vigorosamente cada 10 min. Los blancos se realizaron agregando 500 µl de 2 N de HCl a 500 µl de extracto y se procedió de la misma forma que con las muestras. Las proteínas se precipitaron por el agregado de 500 µl de 20% (p/v) de TCA, luego se centrifugó a 3.000 rpm.

Los precipitados de las proteínas derivatizadas con DNPH obtenidos de manera similar a lo descripto anteriormente se resuspendieron con 250 µl de 500 mM de Tris-HCl (pH 6,8). Luego, se diluyeron con solución amortiguadora de pH

de condiciones desnaturalizante hasta obtener una concentración final equivalente en todas las alícuotas (50 µg) utilizando 100 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 2% (p/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol y 0,01% (p/v) de azul de bromofenol. Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 4 min y se separaron en SDS-PAGE. Se utilizó un gel concentrador 4% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida y de resolución 12% (p/v). La electroforesis se desarrolló estableciendo 170 V constante y utilizando como solución del electrodo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina (pH 8,3) con 10% (p/v) de SDS.

Las proteínas del gel se electrotransfirieron a una membrana de PVDF manteniendo la intensidad de corriente constante (250 mA) durante 50 min. La solución de transferencia usada fue 25 mM de Tris y 192 mM de glicina (pH 8,3) con 20% (v/v) de metanol. Luego de la transferencia se realizó el bloqueo de la membrana utilizando 5% (p/v) de leche descremada preparada en solución PBS durante 1 h. Tras realizar un lavado con PBS para eliminar el exceso de leche, la membrana se incubó durante toda la noche a 4 °C con una dilución 1:20.000 en PBS del anticuerpo primario de conejo anti-DNP (2,4-dinitrofenol). Luego la membrana se lavó 4 veces en un intervalo total de 1 h con solución TBS con 0,1% (v/v) de Tween 20. Posteriormente, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y luego se lavó 4 veces con 0,1% (v/v) de Tween 20 en TBS durante 1 h. Las bandas se revelaron utilizando DAB y H₂O₂ como sustratos. Las membranas se fotografiaron y se analizaron con el software Gel-Pro.

En todos los casos, las fotografías de las membranas que se muestran en los resultados son representativas de las obtenidas en al menos 5 ensayos independientes.

3.14.2. Grupos carbonilo: ciclina D, CDKA y 20S proteasoma

Los precipitados de las proteínas derivatizadas con DNFH (50 µg) obtenido según se describió anteriormente (3.14.1) se resuspendieron en PBS y se separaron por inmunoseparación (ensayo de *pull down*) mediante una cromatografía de

afinidad. La resina de afinidad se preparó uniendo 50 µl de anticuerpos anti-DNP a 100 mg de sefarosa 4% activada con bromuro de cianógeno, siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

Las muestras derivatizadas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con un exceso de resina anti-DNP-agarosa y luego se centrifugaron durante 5 min a 10000 rpm. La resina se lavó 3 veces con PBS, y para liberar las proteínas oxidadas, se añadieron 50 µl de 100 mM de glicina-HCl (pH 2,5). Luego de una incubación durante 10 min a 4 °C, se centrifugó y se separó el sobrenadante cuidadosamente, el cual se ajustó a pH 6,8 con el agregado de 5 µl de 500 mM de Tris-HCl (pH 8,8). Las proteínas obtenidas se separaron por SDS-PAGE al 12,5% (p/v) y se transfirieron a una membrana de PVDF y bajo las mismas condiciones que se describieron anteriormente se identificaron las proteínas utilizando anticuerpos primarios policlonales de conejo anti cyclin D1 y CDK2, para el caso del proteasoma se utilizaron condiciones nativas y 6% para el PAGE y se uso anti 20S proteasoma de maíz.

3.15. Proteínas conjugadas con ubiquitina

3.15.1. Niveles de ubiquitinación total

Alícuotas de proteínas (50 µg) extraídas de la misma manera que la descrita en el punto 3.12.2. se separaron en 10% (p/v) SDS-PAGE y 4% (p/v) en la porción concentradora del gel. Para ello las muestras se diluyeron hasta una concentración final equivalente en todas las muestras con 100 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 2% (p/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol y 0,01% (p/v) de azul de bromofenol y se calentaron durante 4 min a 95 °C. Las condiciones experimentales de la electroforesis, la transferencia y la detección de las proteínas fueron similares a las descritas en el punto anterior (3.14.1), utilizando una dilución 1:200 en PBS del anticuerpo primario de conejo anti-Ub.

3.15.2. Niveles de ubiquitinación específicos: ciclina D y CDKA

Las proteínas totales conjugadas con ubiquitina se separaron mediante inmunoseparación utilizando una cromatografía de afinidad (ensayo de *pull*

down), la cual se preparó uniendo 50 μ l de anticuerpos anti-Ub a 100 mg de sefarosa 4% activada con bromuro de cianógeno, siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

Los homogenatos se incubaron durante toda la noche a 4 °C con un exceso de resina anti-Ub-agarosa y luego se centrifugaron durante 5 min a 10.000 rpm. La resina se lavó 3 veces con PBS, y para liberar las proteínas ubiquitinizadas se añadieron 50 μ l de 100 mM de glicina-HCl (pH 2,5). Luego de una incubación durante 10 min a 4 °C, se centrifugó y se separó el sobrenadante cuidadosamente, el cual se ajustó a pH 6,8 con el agregado de 5 μ l de 500 mM de Tris-HCl (pH 8,8). Las proteínas obtenidas se separaron por SDS-PAGE al 12,5% (p/v) y se transfirieron a una membrana de PVDF y bajo las mismas condiciones que se describieron anteriormente (3.14.1) se identificaron las proteínas utilizando como anticuerpos primarios policlonales anti cyclin D1 y anti CDK2.

3.16. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se determinaron como parámetro de la peroxidación lipídica por el método descrito por Heath y Packer (1968). Los extractos se realizaron homogeneizando 1 g de material vegetal en 10 ml de 20% (p/v) de TCA. Luego de centrifugar a 15.000 rpm durante 20 min a 4 °C, se tomaron alícuotas de 1 ml de los sobrenadantes y se les agregaron 1 ml de 0,5% (p/v) de TBA preparado en 20% (p/v) de TCA y 100 μ l de 4% (p/v) de BHT disuelto en etanol. A continuación, las muestras se incubaron durante 25 min a 95 °C, se enfriaron en un baño de hielo, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 min y se determinó la absorbancia a 532 nm sustrayendo la turbidez medida como la absorbancia a 600 nm. El resultado se expresó como TBARS calculadas a partir del coeficiente de extinción del malondialdehído (155 mM⁻¹ cm⁻¹).

3.17. Cuantificación de los niveles de los transcritos: RT-PCR

3.17.1. Extracción de ARN

El total del ARN se extrajo utilizando el reactivo comercial Power Plant RNA isolation Kit (según protocolo descrito por el fabricante) o realizando un

homogenato a partir de 100 mg de material vegetal en 1 ml de TRIzol. En el segundo caso, se prosiguió la extracción incubando a temperatura ambiente durante 20 min. Luego se agregaron 0,2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente cada 10 min durante 30 min. Luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min y se separó la fase superior acuosa. A dicha fase se le agregaron 0,5 ml de alcohol isopropílico y se agitó por inversión suavemente durante 10 min, al término de los cuales se volvió a centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min. El precipitado obtenido fue enjuagado con una solución de etanol 75% (v/v) y centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el precipitado, una vez eliminada la humedad remanente por contacto con el aire, fue resuspendido en agua destilada libre de ARNasas e incubado durante 10 min a 55-60 °C en un termobloque.

Para medir niveles de transcriptos relacionados con el ciclo celular se tomo como material vegetal los primeros 5 mm de la raíz, para las expansinas se utilizó la región apical y subapical (0-10mm).

3.17.2. Determinación de la calidad del ARN

La calidad de las muestras de ARN fue evaluada mediante la determinación espectrofotométrica de la absorbancia de las mismas a 260 y 280 nm y calculando la relación entre ambas. El ARN total fue desnaturalizado en 50% (v/v) de formamida y 6% (v/v) de formaldehído a 65 °C durante 15 min, fraccionado en un gel desnaturalizante de agarosa conteniendo 0,66 M de formaldehído en solución amortiguadora de Mops (20 mM de Mops pH 7,5, 5 mM de acetato de sodio, 1 mM de EDTA) y con el agregado de bromuro de etidio, con el objetivo de visualizar las distintas bandas obtenidas (Maniatis y col. 1982).

3.17.3. Síntesis de ADNc

Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I y luego fue sintetizado el ADN copia (ADNc) con oligo 18dT como iniciador, usando RevertAid™ M-MuLV transcriptasa reversa.

3.17.4. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo usando los iniciadores y condiciones descriptas en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Iniciadores para amplificar segmentos de ADNc de *Triticum aestivum* L.

Gen	Iniciadores Sentido y antisentido	Número de acceso (GenBank ID)	Tamaño amplificación (pb)	Condiciones PCR
<i>pcna</i>	5'-CACCAAGGAGGGTGTCAAGT 5'-GATCTTGGGGTGCCAGATAA	AK335595	367	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>rdr</i>	5'-TTCCCCATCCGGTTCCCGCA 5'-TGAGCCCGCGCTTCTTGAGC	TC378650	508	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 53 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>mcm2</i>	5'-ACGACGGCGCCACCGTTATC 5'-TTGCGATGAAGCGCCGGAAT	AY532594	552	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>EXPB8</i>	5'-GGTGTTCATAGTCGACCAATATGG 5'-AGAGCAGGAAGGGTGTGTGG	AY543542	351	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>EXPB10</i>	5'-GAAGACCTGTAGTGCCAATATGGCTGG 5'-GTCGGTGATGACGATCCTCC	AY543544	373	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>EXPA5</i>	5'-CGACGACATGGCGGTCATCAAGATG 5'-CCCGTTGATGGTGAACCTGA	AY543531	499	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>EXPA 6</i>	5'-ATGGCAGCTGGGATGCGCTTCCT 5'-CGGTAGATGGCGAGGTTCTC	AY543532	422	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 53 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>EXPA8</i>	5'-CGAGCATCTCCGCACTTGCAAATTCAAG 5'-GCCTGGGCGATCTTAGTGAA	AY543534	482	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 53 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>actina</i>	5'-GGATCGGTGGCTCTATTTTG 5'-TGTACCCCTTATTCCTCTGAGG	AB181991	224	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 53 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>cat1</i>	5'-ACTACGACGGGCTCATG 5'-GCGCACTCCATGGACTG	E16461	373	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 52 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>cat2</i>	5'-CCTTAATCAGCAGGGATG 5'-AGATAGAACACGCGGAG	X94352	611	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 53 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>cat3</i>	5'-AGCTTCGACACCAAGACGAC 5'-GACGAGGGTGGCCTCTGTC	HQ860268	699	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C
<i>tubulina 5</i>	5'-TTCCTGCACTGGTACACGGG 5'-AGCCATCAGAAATAGCCCCG	U76896	228	3 min 95 °C; 30 ciclos: 30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C; 10 min 72 °C

Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en geles de agarosa 1,2% (p/v) utilizando 70 V constante y visualizados con bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron con un equipo Fotodyn y se analizaron utilizando el programa GelPro. Las intensidades de las bandas se expresaron como unidades

arbitrarias basadas en la integración de la densidad óptica absoluta de cada banda. Se utilizó a los transcriptos de actina y tubulina 5 para normalizar y calcular los valores de ARNm

3.18. Análisis estadístico

En forma general se trabajó con tres muestras independientes, con cinco réplicas cada una. Los valores fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por Análisis de la Varianza, estableciendo como diferencia significativa $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

4. Instrumental

El equipamiento usado para llevar a cabo este trabajo de Tesis consistió en: centrífuga para microtubos (Eppendorf® - Rotor F 45-30-11), centrífuga de mesa (Sorvall® Instruments ECONOSPIN DuPont, rotor H1323), centrífugas refrigeradas (Sorvall RC-5B, Sorvall RC-5C, rotor SS-34), peachímetro (Chemcadet), sistema purificador de agua Milli-Q (Milli-Pore), espectrofotómetro (Hitachi U-2000), agitador rotatorio (New Brunswick, Modelo G25), agitador orbital (Decalab), equipos vertical de electroforesis (Mini-PROTEAN III BioRad) y transferencia (Mini Trans-Blot BioRad), fuente de poder (LKB 2197 Bromma y BioRad PowerPac Basic), termociclador (Ivema), cuba horizontal para geles (BioRad), transiluminador (DyNA light, Labnet), equipo de fotografía para geles (Fotodyne) con conexión a computadora, osmómetro (Wescor Vapro 5520), conductímetro (HI 9813 Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, RI), microscopio de fluorescencia (DMLS, 121 Leica).

También se contó con equipamiento de cómputos, cámara digital, heladeras tipo comercial con freezer, freezers -20°C y -80°C, granizadora, estufas de secado y esterilización, destiladores, balanzas analíticas, baños termostatzados.

5. Informática

5.1 Bioinformática

Para la búsqueda de secuencias de trigo se utilizaron las bases de datos primarias públicas disponibles Entrez del NCBI (National Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>. Se empleó el programa de alineamientos de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Para los alineamientos múltiples se utilizó el programa Clustal Omega del EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) <http://www.ebi.ac.uk>. Para el diseño de iniciadores específicos para la PCR se utilizó el programa Primer 3 Plus <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

5.2. Software

Para la realización de este trabajo se utilizaron aplicaciones informáticas como Microsoft OFFICE, GelPro Analyzer e Image Pro Plus (Media cybernetics, LP), InStat® (GraphPad Software, Inc) y STATISTICA Software (StatSoft, Inc).

Capítulo 4

Metales

Resultados

1. Cadmio, metilviológeno y peróxido de hidrógeno

1.1. Efecto de los tratamientos sobre los parámetros de crecimiento

Los tratamientos con Cd^{2+} , MV y H_2O_2 en las condiciones ensayadas no modificaron el índice de germinación (IG), en todos los casos el IG se mantuvo similar al observado en las semillas incubadas en el medio control.

El efecto que el metal y los agentes oxidantes tuvieron sobre el crecimiento se determinó midiendo la longitud y la biomasa de la raíz primaria. En la Figura 4.1 se puede observar que el largo promedio de la raíz primaria disminuyó significativamente con 10 μM de Cd^{2+} (59%) luego de 48 h de tratamiento. La mayor concentración de metal utilizada (100 μM de Cd^{2+}) si bien permitió la germinación, detuvo totalmente el crecimiento de la plántula. Por otro lado se registró una significativa reducción del largo de la raíz con 0,5 μM de MV y 1 mM de H_2O_2 en el medio de cultivo (54% y 27% respectivamente, en relación al valor control). A partir de estos datos se continuaron los estudios utilizando 1 y 10 μM de Cd^{2+} , 0,5 μM de MV y 1 mM de H_2O_2 .

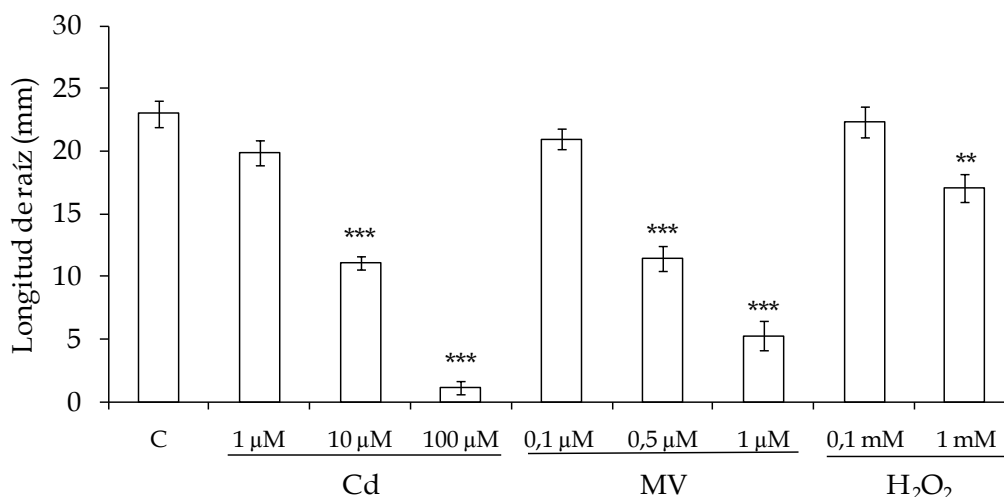


Figura 4.1. Efecto del Cd^{2+} , MV y H_2O_2 sobre el largo de la raíz primaria de trigo a las 48 h de tratamiento. Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey.

La biomasa, determinada como PF, disminuyó significativamente con los tratamientos de 10 μM de Cd^{2+} , 0,5 μM de MV y 1 mM de H_2O_2 (63, 78 y 22% respectivamente, en relación al valor control). En los casos de MV y H_2O_2 estos

porcentajes de disminución del PF se mantuvieron cuando se determinó el PS (respecto del PS del control), de manera que la MSR % calculada no se modifica de forma sustancial en las raíces de las plántulas tratadas con respecto de los controles. Por el contrario, un aumento en la MSR % se observa en las raíces de las plántulas sometidas a tratamiento con 10 μM de Cd^{2+} (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Efecto del cadmio y los tratamientos oxidantes sobre el peso fresco (PF), peso seco (PS) y masa seca relativa porcentual (MSR %) de la raíz. El PF y el PS se expresan como mg por planta.

Tratamiento	PF	PS	MSR (%)
Control	12,12 \pm 0,73	0,77 \pm 0,16	6,36
1 μM Cd^{2+}	10,25 \pm 0,82	0,58 \pm 0,24	5,65
10 μM Cd^{2+}	4,46 \pm 0,99**	0,47 \pm 0,10**	10,54
0,5 μM MV	2,69 \pm 0,51***	0,19 \pm 0,05***	7,06
1 mM H_2O_2	9,46 \pm 0,83*	0,67 \pm 0,08*	7,08

Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey.

Los tratamientos que afectaron el largo de la raíz (10 μM de Cd^{2+} , 0,5 μM de MV y 1 mM de H_2O_2) aceleraron el desplazamiento de las células encontradas en la zona de división celular a la zona de elongación/diferenciación, lo que resultó en un meristema acortado respecto del control (Figura 4.2).

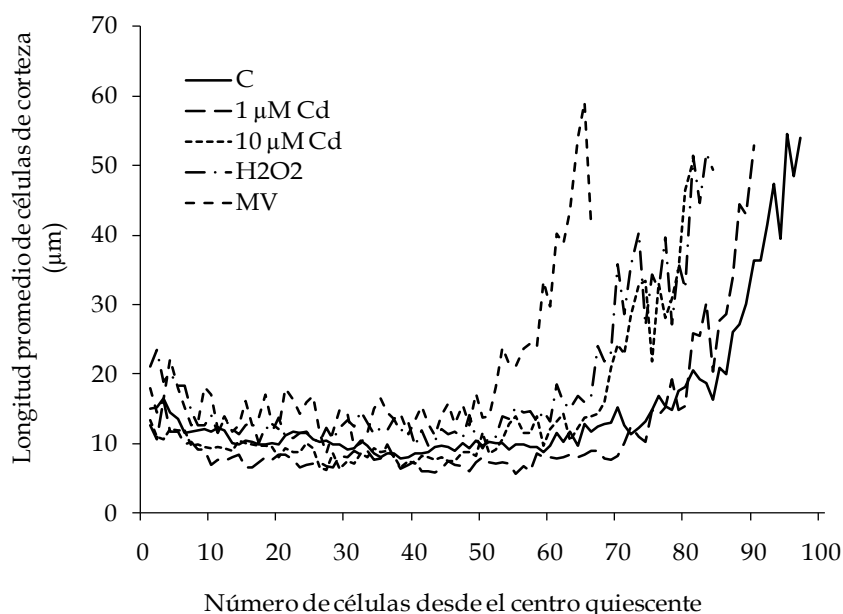


Figura 4.2. Largo de células de la corteza del meristema de la raíz estimado utilizando el programa Image Pro Plus.

Como muestra la Figura 4.3, la viabilidad celular en el ápice de la raíz no fue afectada por los tratamientos.

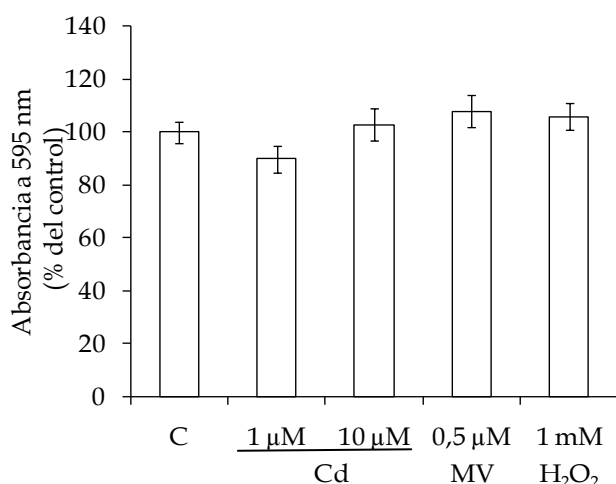


Figura 4.3. Muerte celular determinada en el ápice de la raíz de trigo expresada como incorporación de Azul de Evans y relativizada al valor control. Los valores expresan la media \pm SEM.

1.2. Producción de especies activas del oxígeno

En la Figura 4.4 se muestran imágenes representativas del extremo de la raíz obtenidas utilizando dos sondas fluorogénicas, ambas ampliamente usadas para detectar la generación de EAO.

Los tratamientos con Cd^{2+} y MV mostraron fluorescencia verde originada por la oxidación de H_2DCFDA mediada por las EAO, la cual no se detectó en los ápices radiculares de las plántulas control. La acumulación de EAO fue menor para $1 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} respecto de los niveles observados para $10 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} y $0,5 \mu\text{M}$ de MV. El tratamiento con ácido ascórbico (ASC) (un atrapante de H_2O_2) previo a la incubación con H_2DCFDA redujo de manera considerable la fluorescencia verde en la raíz de las plántulas tratadas con $0,5 \mu\text{M}$ de MV (último panel en la Figura 4.4A), similar resultado se obtuvo con el tratamiento que utilizó $10 \mu\text{M}$ Cd^{2+} en el medio de incubación. La fluorescencia roja, dependiente de O_2^- , de la sonda DHE se indujo en el extremo de la raíz en los tratamientos con $0,5 \mu\text{M}$ de MV respecto de las raíces controles (Figura 4.4B). La incubación previa con Cl_2Mn (un agente dismutante de O_2^-) previo al tratamiento con MV revirtió el incremento de fluorescencia roja (Figura 4.4B, último panel). En los tratamientos con cadmio no se detectó acumulación de O_2^- en el extremo radicular (Figura 4.4B).

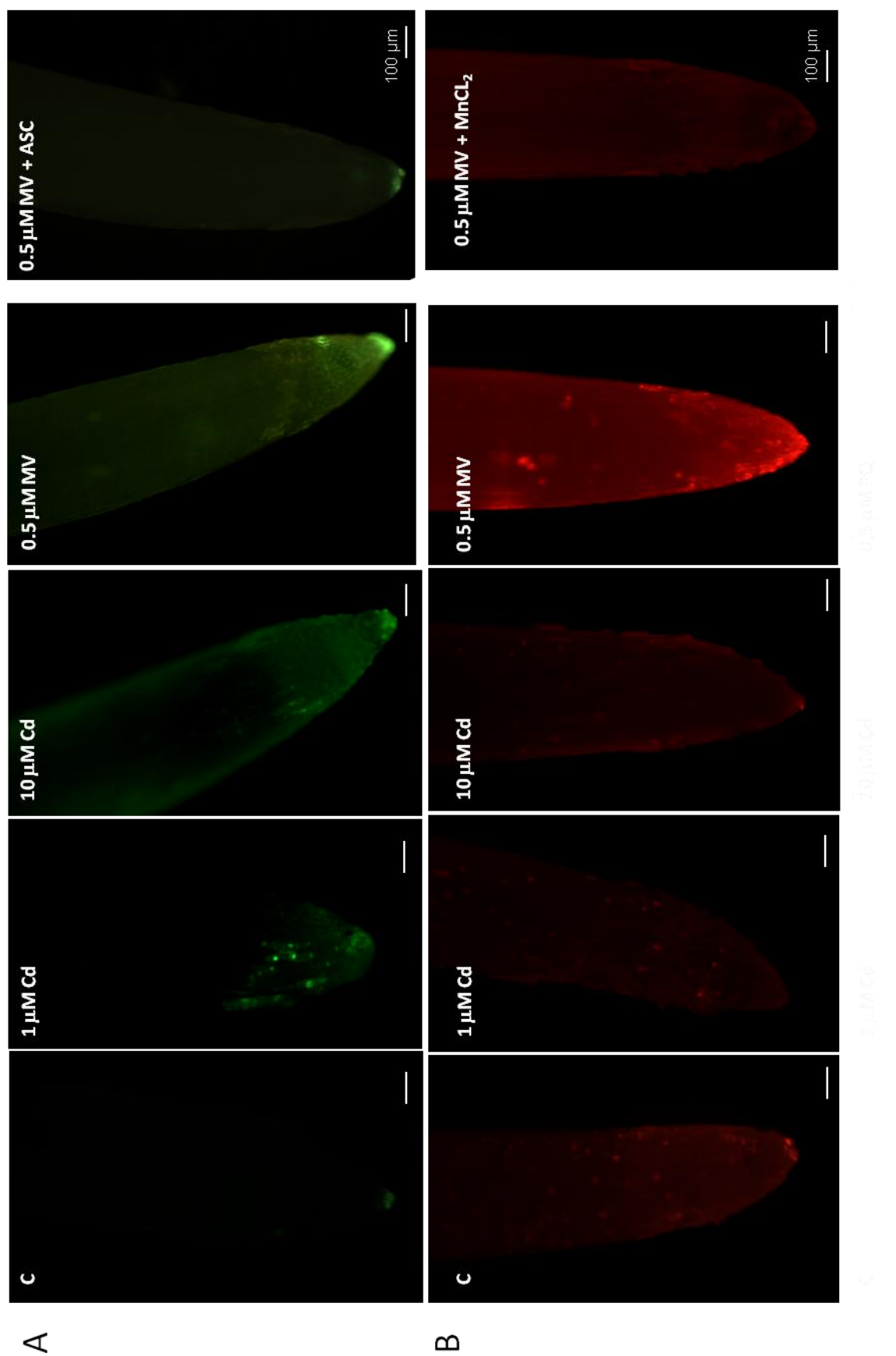


Figura 4.4. (en la página anterior). Acumulación de EAO en el extremo de la raíz determinada mediante el uso de sondas fluorescentes. (A) H₂DCFDA como sonda de H₂O₂/peróxidos y (B) DHE como sonda de O₂⁻, según lo descrito en Materiales y métodos. Donde se indica, las raíces fueron incubadas con 1 mM de ASC o 4 mM de MnCl₂ previo al tratamiento con la respectiva sonda.

1.3. Oxidación y conjugación de proteínas con ubiquitina

1.3.1. Análisis sobre el total de las proteínas solubles

A excepción de 1 μ M de Cd²⁺, todos los tratamientos produjeron incremento de los grupos carbonilos en las proteínas del ápice de la raíz, observándose una mayor oxidación en el tratamiento con MV (Figura 4.5A y B).

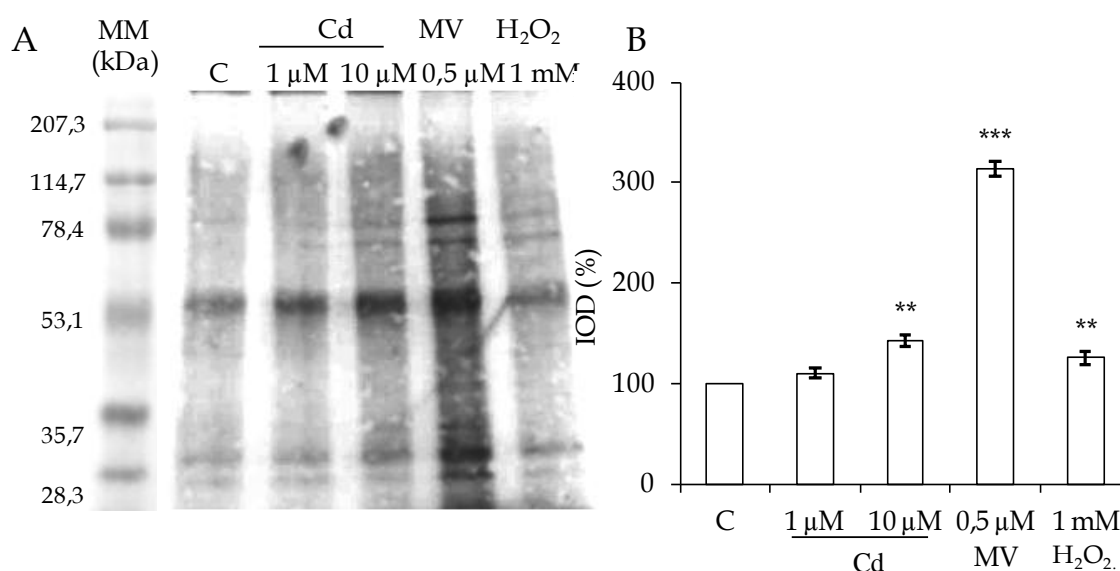


Figura 4.5. Proteínas modificadas oxidativamente extraídas del ápice de la raíz de trigo. (A) Proteínas derivatizadas con DNPH, el Western blot se realizó utilizando anticuerpos anti-DNP, (B) cuantificación de las proteínas oxidadas expresadas como unidades arbitrarias (asumiendo un valor control igual a 100), basado en la integración de la densidad óptica absoluta (IOD) de cada línea. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey. La posición del marcador de masa molecular (en kDa) se muestra a la izquierda.

Si bien el aumento en el contenido de proteínas solubles oxidadas fue un efecto general de los tratamientos, estos mostraron similitud en el patrón de bandas de las proteínas solubles y de las proteínas conjugadas con ubiquitina, teniendo en consideración la sensibilidad de la técnica utilizada (Figura 4.6A y B).

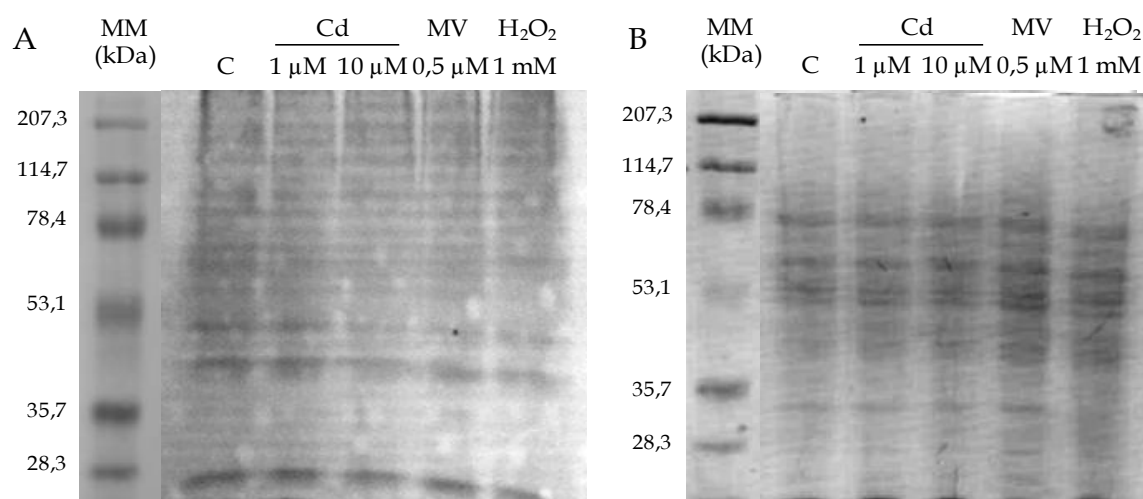


Figura 4.6. Proteínas solubles y conjugadas con ubiquitina extraídas del ápice de la raíz de trigo. Las proteínas fueron sometidas a un SDS-PAGE (10% p/v). (A) Western blot utilizando anticuerpos anti-Ub, (B) PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. La posición del marcador de masa molecular (en kDa) se muestra a la izquierda.

1.3.2. Análisis de proteínas específicas

El uso de anticuerpos dirigidos directamente contra la ciclina D y la CDKA reveló que no se produce modificación en la abundancia de estas proteínas; sin embargo los tratamientos con 10 μM de Cd^{2+} y las EAO resultaron en un aumento en el nivel de carbonilación de estas proteínas. El MV fue el agente oxidante más efectivo para causar carbonilación específica, seguido por 10 μM de Cd^{2+} (Figura 4.7A y B).

Si bien no se detectaron modificaciones en el nivel de proteínas conjugadas con Ub (Figura 4.6A), los tratamientos oxidantes disminuyeron la ubiquitinación de las proteínas ciclina D y CDKA (Figura 4.7A y B).

A nivel de la proteína proteasoma 20S los tratamientos con Cd y los agentes oxidantes no modificaron su nivel de expresión y, si bien produjeron un aumento del nivel de oxidación de la proteína, no aumentaron su fragmentación (Figura 4.8).

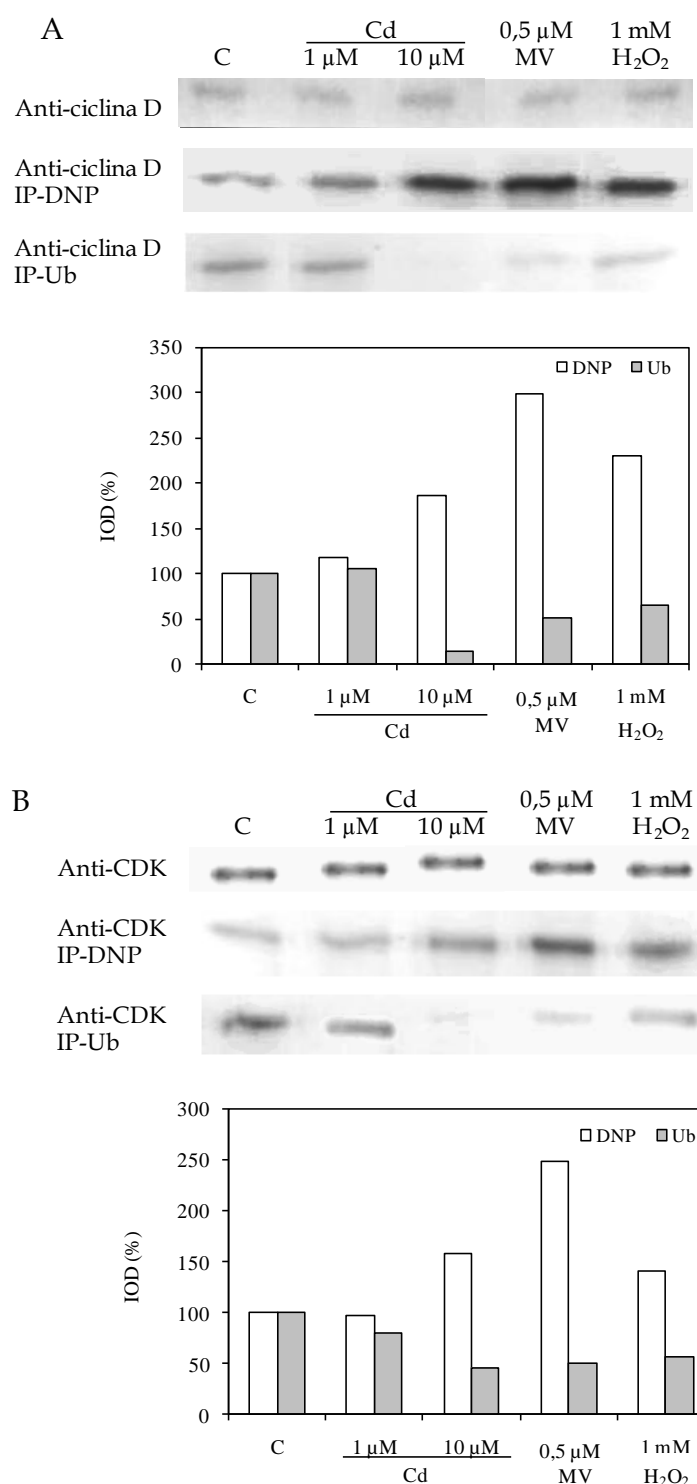


Figura 4.7. Efecto del cadmio y las EAO sobre los niveles de expresión, oxidación y conjugación con ubiquitina de las proteínas ciclina D y CDKA del ápice de la raíz. (A) Western blot con el anticuerpo primario anti-ciclina D (Anti ciclina D), luego de la derivatización con DNFH seguido de inmunoseparación con anti-DNP (Anti-ciclina D IP-DNP), y luego de la inmunoseparación con anti-Ub (Anti-ciclina D IP-Ub). (B) Western blot utilizando anticuerpo anti-CDK (Anti-CDK), luego de derivatizar con DNFH seguido de inmunoseparación con anti-DNP (Anti- CDK IP-DNP), y luego de la inmunoseparación con anti-Ub (Anti-CDK IP-Ub). La cuantificación de las bandas se expresa como unidades arbitrarias (asumiendo el valor control igual a 100), basado en la integración de la densidad óptica absoluta (IOD) de cada banda.

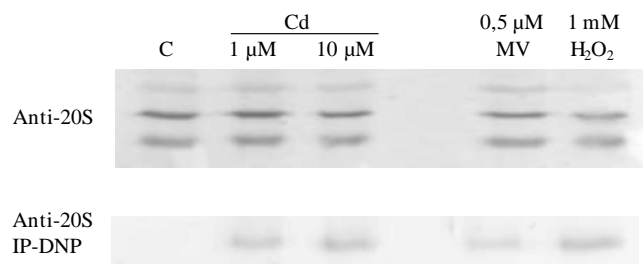


Figura 4.8. Efecto del cadmio y las EAO sobre la expresión y oxidación del proteasoma 20S en el ápice de la raíz. Western blot con el anticuerpo primario anti-proteasoma 20S (Anti 20S) (SDS-PAGE), luego de la derivatización con DNFH seguido de inmunoseparación con anti-DNP (Anti-20S IP-DNP) (PAGE nativo).

1.4. Efecto del cadmio y las EAO sobre la acumulación de transcritos relacionados con proteínas del ciclo celular

Para evaluar la progresión del ciclo celular se determinaron los niveles de transcripción de genes marcadores relacionados con la transición G1-S. El análisis mediante RT-PCR reveló que las condiciones oxidantes provocaron una disminución en la acumulación de transcritos de miembros de la vía relacionada con E2F/Rb. El nivel de los transcritos de *mcm2*, *rdr* y *pcna* disminuyó luego de 48 h de exposición a 10 μM de Cd²⁺ y a las EAO, determinados en el RAM de trigo (Figura 4.9).

1.5. Efecto del cadmio y las EAO sobre la acumulación de transcritos de expansinas de expresión radicular

Los tratamientos con cadmio y con los agentes oxidantes tuvieron un patrón común de respuesta de las expansinas, incrementando la acumulación de transcritos de *EXPB10* y *EXPA6*, y disminuyendo los niveles de transcritos de *EXPB8* (Figura 4.10).

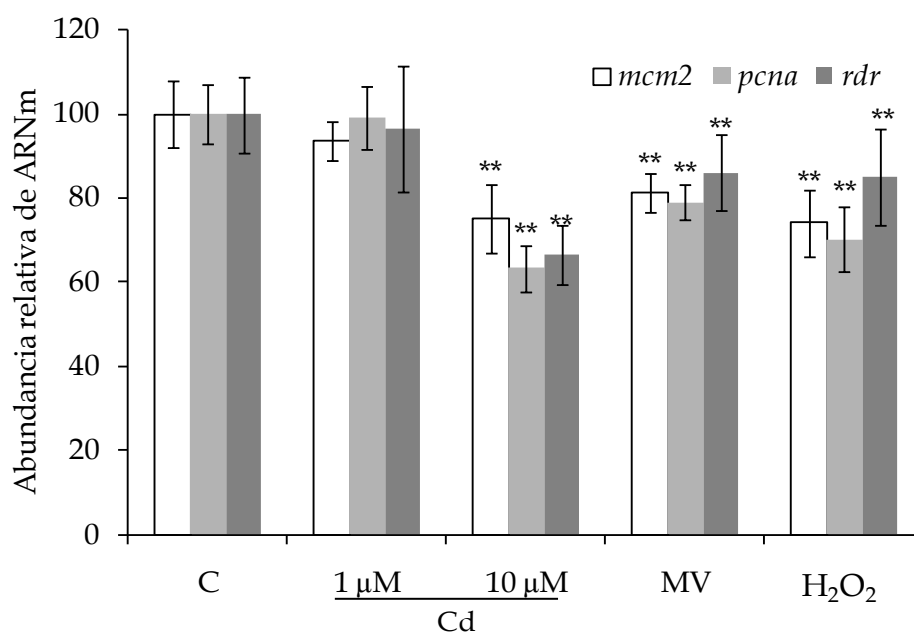


Figura 4.9. Efecto del cadmio, MV y H₂O₂ sobre el nivel de transcritos de algunos genes blancos de la vía Rb/E2F. La normalización se realizó asumiendo 100 el valor control. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control **P< 0,01 según el Test de Tukey.

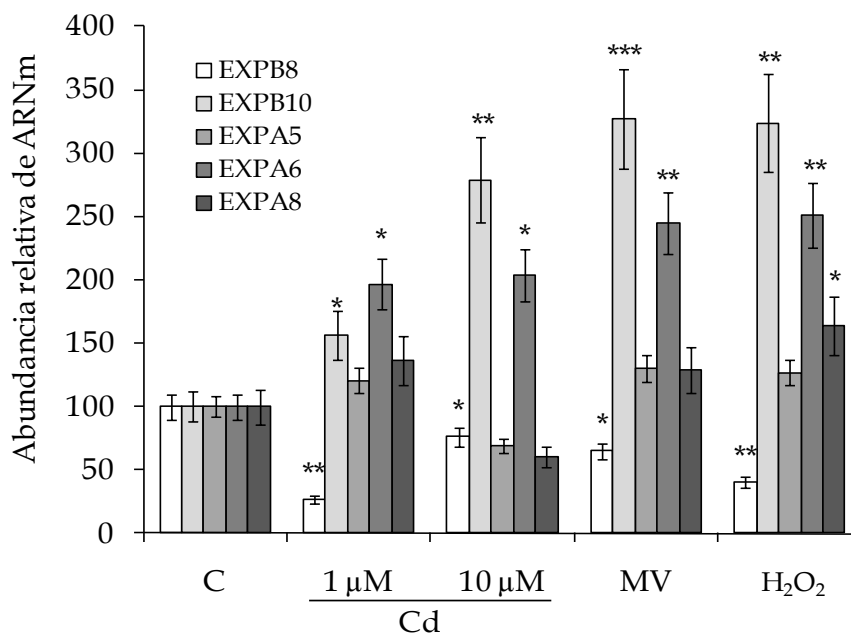


Figura 4.10. Efecto del cadmio, MV y H₂O₂ sobre el nivel de transcritos de expansinas. La normalización se realizó asumiendo 100 el valor control. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control *P<0,05, **P< 0,01 y ***P< 0,001 según el Test de Tukey.

1.6. Contenido de prolina

La máxima concentración de cadmio (10 μM), el MV y el H_2O_2 aumentaron la concentración de prolina en la raíz de las plantas tratadas, este incremento fue del 143%, 107% y 94% respectivamente sobre el valor obtenido en las plantas control (Figura 4.11).

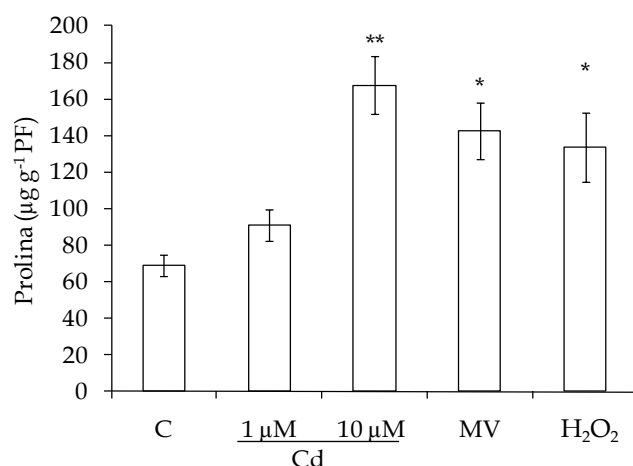


Figura 4.11. Efecto del Cd, MV y el H_2O_2 sobre la acumulación de prolina en la raíz. Los valores expresan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ según el Test de Tukey.

2. Cobre

2.1. Efecto del cobre sobre los parámetros de crecimiento

La presencia de cobre en el medio de incubación no modificó el IG, que se mantuvo en valores similares al obtenido en las semillas control (superior al 90%). Sin embargo, el tratamiento con el metal afectó el crecimiento, causando una reducción en el largo de raíz cuando se lo utilizó en concentraciones de 5 μM y mayores en el medio de incubación (disminución de 36 y 56% para 5 y 10 μM de Cu^{2+} respectivamente, en relación al valor control). Como lo observado para el tratamiento con 100 μM de Cd^{2+} , la misma concentración de cobre si bien no inhibió la germinación, reprimió totalmente el crecimiento (Figura 4.12).

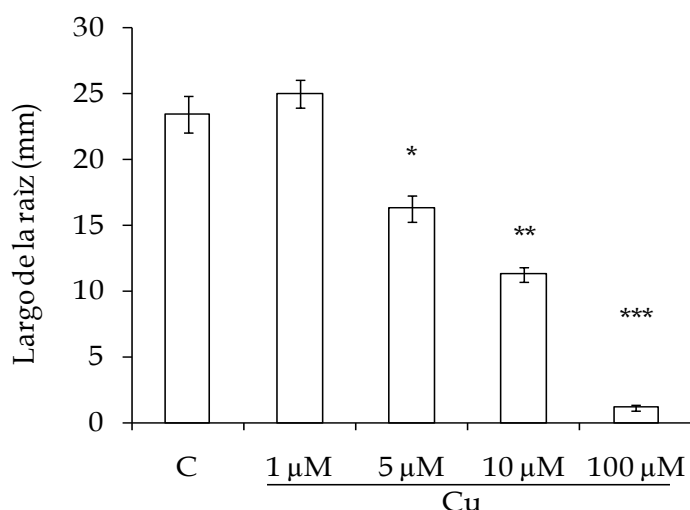


Figura 4.12. Efecto del cobre sobre el largo de la raíz de trigo a las 48 h de tratamiento. Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey.

Respecto de la biomasa, el tratamiento con 1 μM de Cu^{2+} mostró un incremento de PS de un 15% aproximadamente respecto del control. Por otro lado, el aumento de la concentración del metal en el medio de incubación redujo la biomasa (medida tanto como PF o PS) de forma significativa, aproximadamente un 24% respecto del valor control (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Efecto del tratamiento con cobre sobre el peso fresco (PF), peso seco (PS) y masa seca relativa (MSR %) de la raíz. El PF y el PS se expresan como mg por planta.

Tratamiento	PF	PS	MSR (%)
Control	12,10 \pm 0,69	0,79 \pm 0,20	6,51
1 μM Cu^{2+}	12,40 \pm 1,12	0,91 \pm 0,14*	7,30*
5 μM Cu^{2+}	8,65 \pm 0,95*	0,60 \pm 0,10*	6,91

Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey.

De manera similar a lo observado con el uso de 10 μM de Cd^{2+} , MV y H_2O_2 , la concentración de cobre que redujo el largo de la raíz provocó un meristema acortado respecto de las raíces control (Figura 4.13).

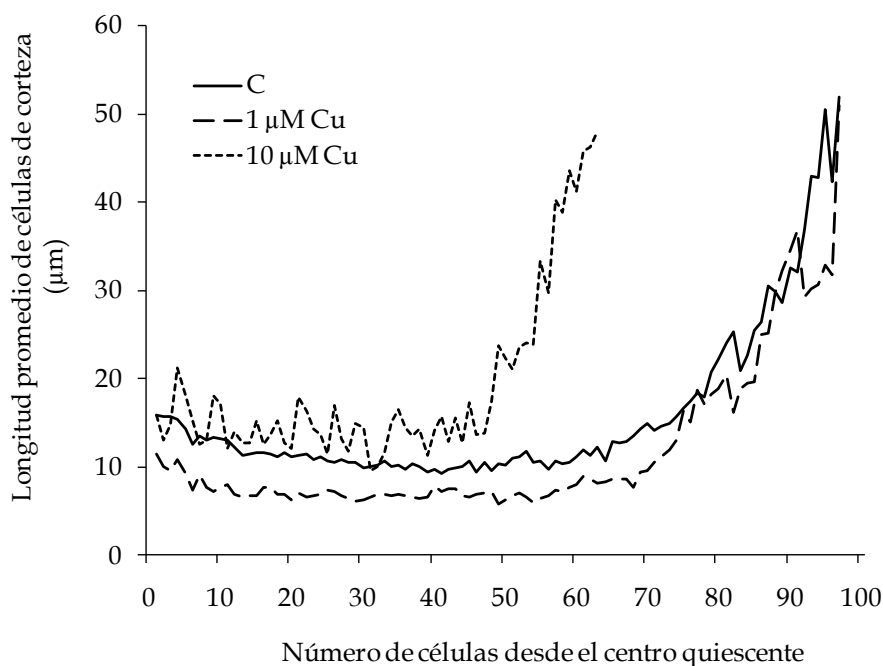


Figura 4.13. Largo de células de la corteza del meristema de la raíz estimado utilizando el programa Image Pro Plus.

Al mismo tiempo, la presencia de cobre en concentraciones mayores a 1 μM afectó la viabilidad celular en el RAM (Figura 4.14).

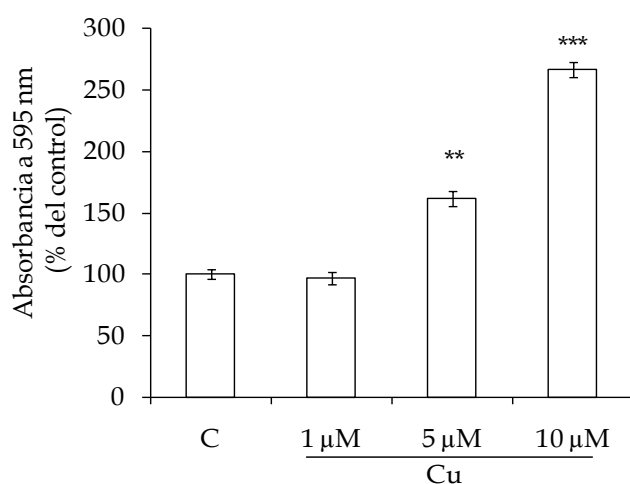


Figura 4.14. Muerte celular determinada en el ápice de la raíz de trigo expresada como incorporación de Azul de Evans y relativizada al valor control. Los valores expresan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey.

2.2. Producción de especies activas del oxígeno

La presencia de 10 μM de cobre en el medio de incubación indujo la generación de EAO en el RAM, demostrada mediante la oxidación de las dos sondas fluorogénicas usadas para la detección y su reversión por la preincubación con los atrapanes manganeso y ácido ascórbico (Figura 4.15).

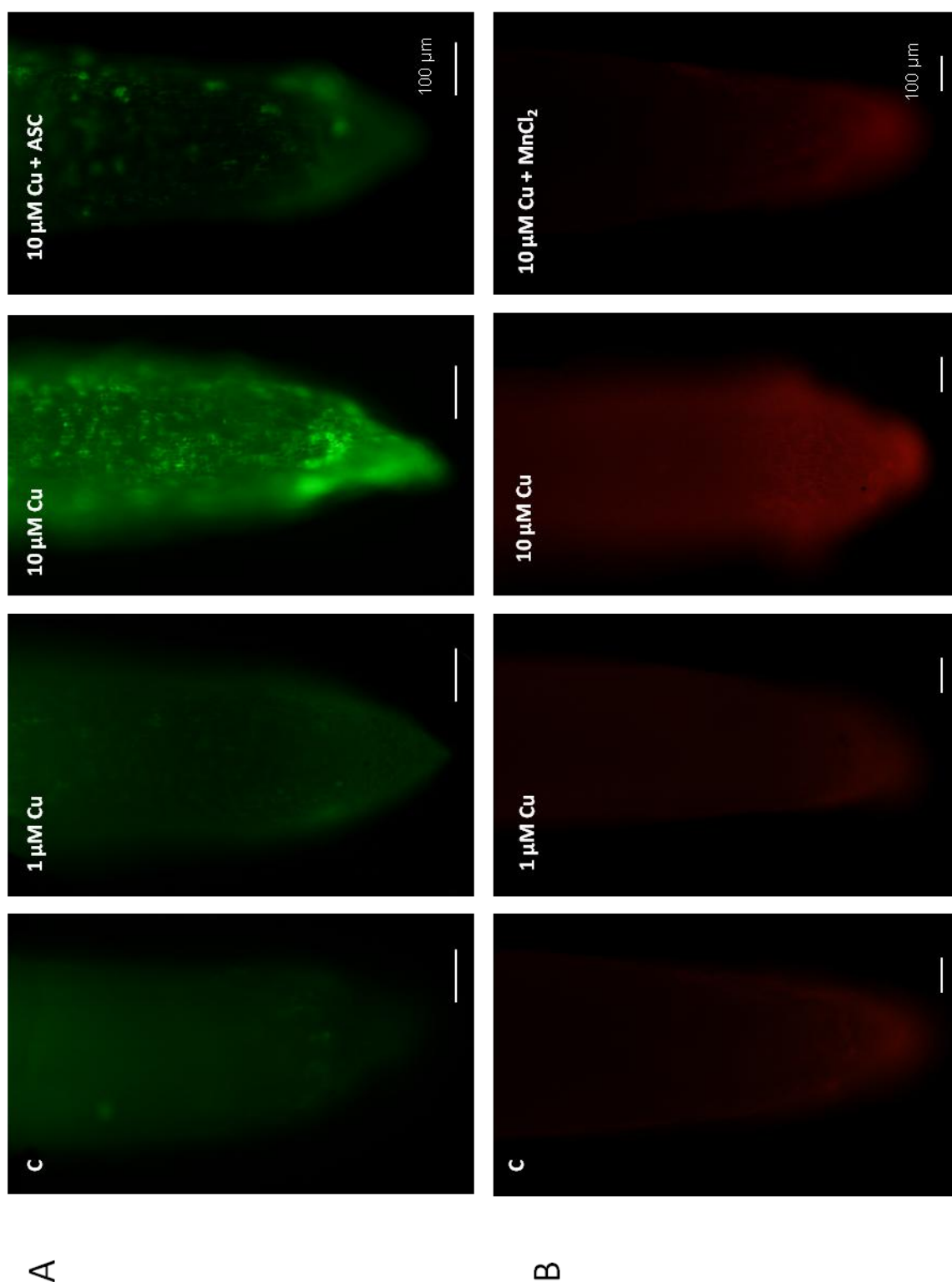


Figura 4.15. Acumulación de EAO en el extremo de la raíz determinada mediante el uso de sondas fluorescentes. (A) H_2DCFDA como sonda de H_2O_2 /peróxidos y (B) DHE como sonda de O_2^- , según lo descrito en Materiales y métodos. Donde se indica, las raíces fueron incubadas con 1 mM de ASC o 4 mM de Cl_2Mn previo al tratamiento con la respectiva sonda.

2.3. Oxidación y conjugación con ubiquitina de proteínas

2.3.1. Análisis sobre el total de las proteínas solubles

La inclusión de cobre en el medio de incubación incrementó el nivel de los grupos carbonilos en las proteínas del ápice de la raíz (Figura 4.16A y B).

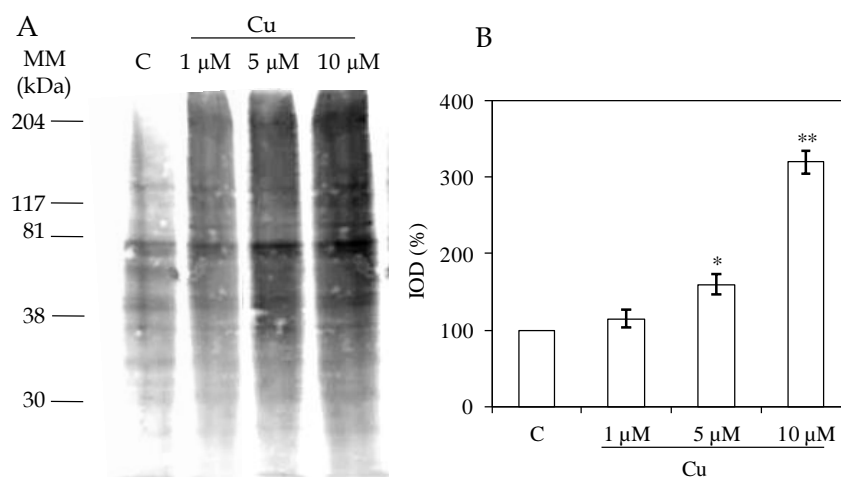


Figura 4.16. Proteínas modificadas oxidativamente extraídas del ápice de la raíz de trigo. (A) Proteínas derivatizadas con DNFH, el Western blot se realizó utilizando anticuerpos anti-DNP, (B) cuantificación de las proteínas oxidadas expresadas como unidades arbitrarias (asumiendo un valor control igual a 100), basado en la integración de la densidad óptica absoluta (IOD) de cada línea. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ según el Test de Tukey. La posición del marcador de masa molecular (en kDa) se muestra a la izquierda.

Tal como se observó en el tratamiento con Cd^{2+} , MV y H_2O_2 , tanto las proteínas solubles como las conjugadas con ubiquitina mostraron perfiles similares (no se incluyen fotografías).

2.3.2. Análisis de proteínas específicas

Los tratamientos con cobre no afectaron la abundancia de la ciclina D ni la de CDK2, sin embargo la mayor concentración de cobre ($10 \mu\text{M}$ de Cu^{2+}) incrementó los niveles de oxidación de estas proteínas y disminuyó el nivel de las conjugadas con Ub (Figura 4.17A y B).

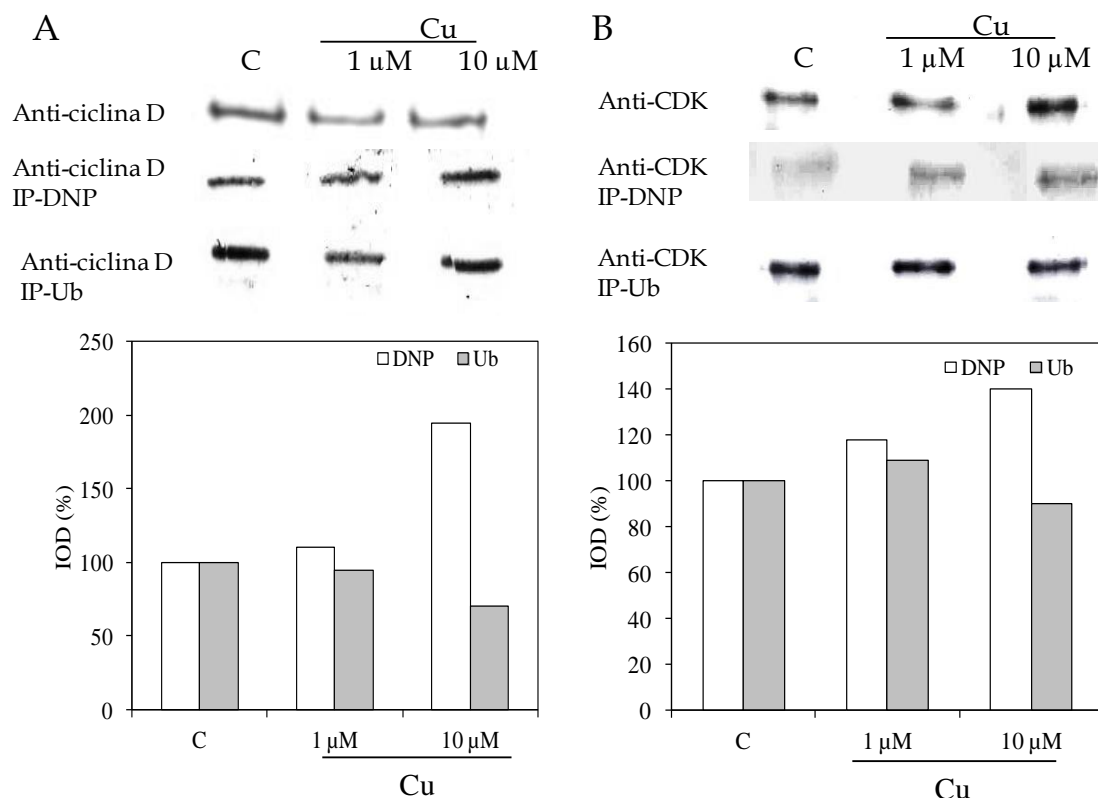


Figura 4.17. Efecto del cobre sobre la expresión, oxidación y conjugación con ubiquitina de las proteínas ciclina D y CDKA del ápice de la raíz. (A) Western blot con el anticuerpo primario anti-ciclina D (Anti ciclina D), luego de la derivatización con DNFH seguido de inmunoseparación con anti-DNP (Anti-ciclina D IP-DNP), y luego de la inmunoseparación con anti-Ub (Anti-ciclina D IP-Ub). (B) Western blot utilizando anticuerpo anti-CDK (Anti-CDK), luego de derivatizar con DNFH seguido de inmunoseparación con anti-DNP (Anti- CDK IP-DNP), y luego de la inmunoseparación con anti-Ub (Anti-CDK IP-Ub). La cuantificación de las bandas se expresa como unidades arbitrarias (asumiendo el valor control igual a 100), basado en la integración de la densidad óptica absoluta (IOD) de cada banda.

A nivel de proteína 20S, el cobre no modificó su expresión ni el grado de fragmentación, pero de manera similar para lo observado con ciclina D y CDKA, el uso de 10 μ M de Cu^{2+} en el medio de incubación aumentó el grado de oxidación de la proteína 20S (Figura 4.18).

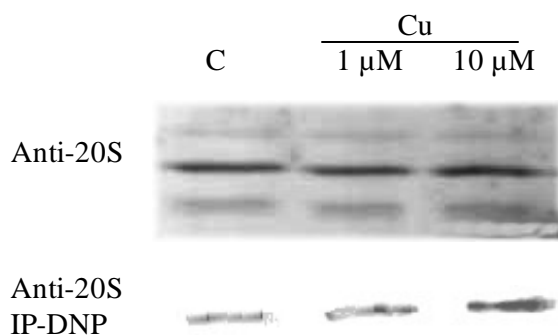


Figura 4.18. Efecto del cobre sobre la expresión y oxidación del proteasoma 20S en el ápice de la raíz. Western blotting con el anticuerpo primario anti-proteasoma 20S (Anti 20S) (SDS-PAGE), luego de la derivatización con DNFH seguido de inmunoseparación con anti-DNP (Anti-20S IP-DNP) (PAGE nativo).

2.4. Efecto del cobre sobre la acumulación de transcritos relacionados con proteínas del ciclo celular

La inclusión de 1 μM de Cu^{2+} en el medio de incubación no modificó significativamente el nivel de ARNm de los transcritos analizados (*pcna*, *rdr* y *mcm2*). Pero la utilización de mayor concentración (10 μM) disminuyó significativamente la acumulación de ARNm de genes dependientes de la vía E2F/Rb.

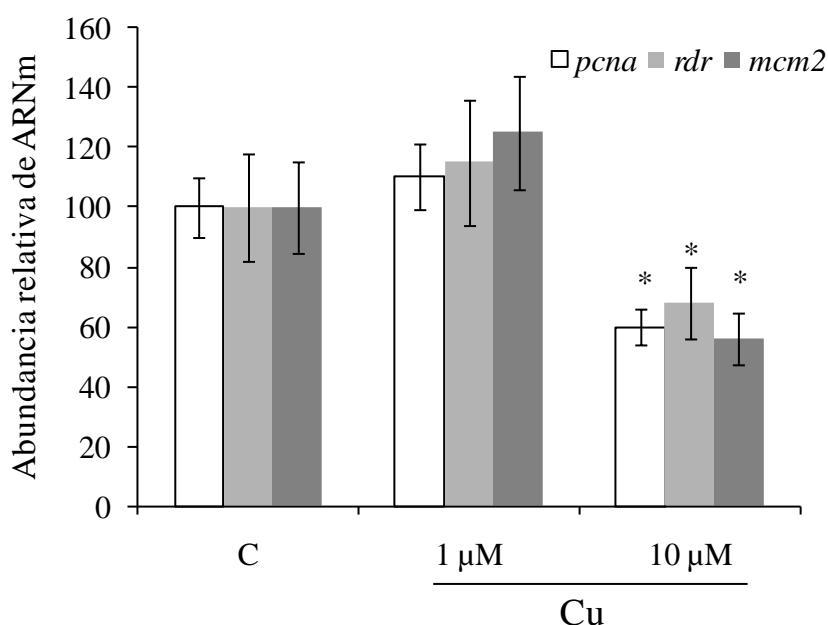


Figura 4.19. Efecto del cobre sobre el nivel de transcritos de algunos genes blancos de E2F/Rb. La normalización se realizó asumiendo 100 el valor control. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control * $P < 0,05$ según el Test de Tukey.

2.5. Efecto del cobre sobre la acumulación de transcritos de expansinas de expresión radicular

El cobre, a excepción de EXPB8, incrementó la acumulación de los transcritos de expansinas analizados. De manera interesante este aumento en los niveles de transcritos fue mayor con la menor concentración de cobre ensayada (Figura 4.20). La acumulación de ARNm de EXPB8 disminuyó con 10 μM de cobre.

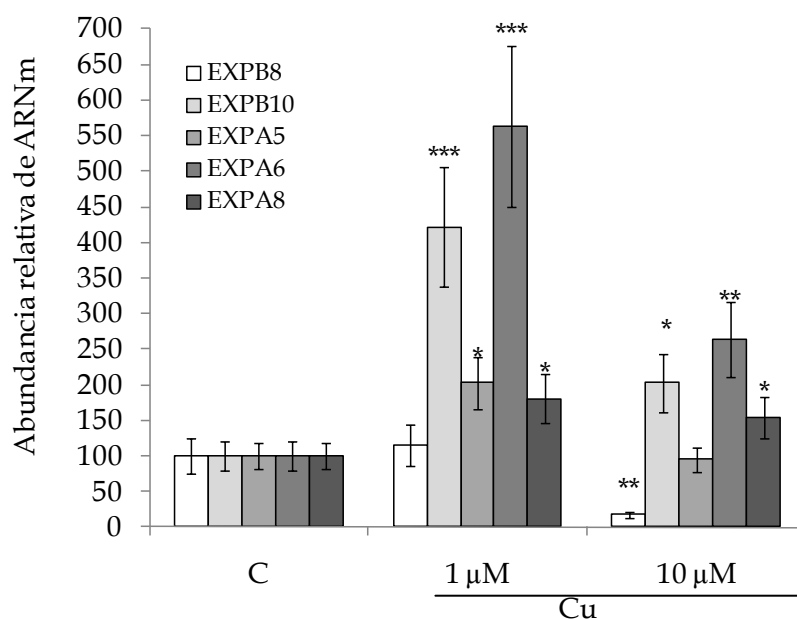


Figura 4.20. Efecto del cobre sobre el nivel de transcritos de expansinas. La normalización se realizó asumiendo 100 el valor control. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey.

2.6. Contenido de prolina

El cobre incrementó la acumulación de prolina en la raíz, 64 y 88% sobre el valor control para 1 y 10 μM de Cu^{2+} , respectivamente (Figura 4.21).

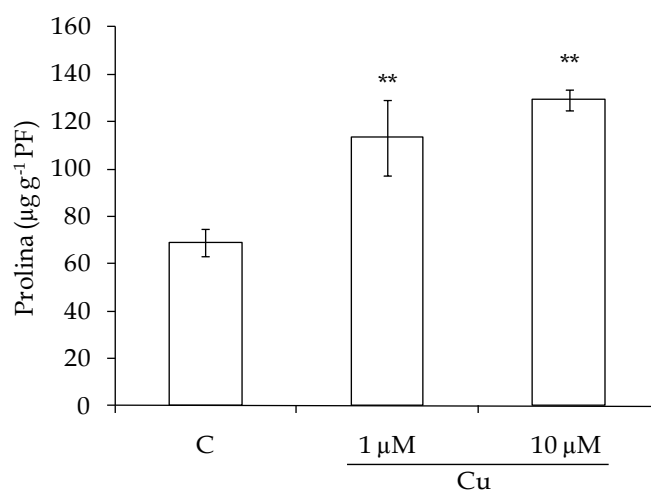


Figura 4.21. Efecto del cobre sobre la acumulación de prolina en la raíz. Los valores expresan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas por cada columna con respecto al valor control ** $P < 0,01$ según el Test de Tukey.

Discusión

3. Los metales y los agentes oxidantes

3.1. El crecimiento

Los metales considerados fitotóxicos (entre ellos el Cd^{2+} , Pb^{2+} o Hg^{2+}) tanto como los micronutrientes en concentraciones mayores a las requeridas por las plantas (como el Cu^{2+} y el Fe^{2+}), están ampliamente asociados con inhibición del crecimiento vegetal y con producción de estrés oxidativo (Alaoui-Sossé y col. 2004, Navari-Izzo y col. 2006, Pena y col. 2008, Gajewska y Skłodowska 2010). Las raíces muestran alta sensibilidad a la toxicidad de iones metálicos, es por ello que se ha utilizado clásicamente la posibilidad de mantener alta tasa relativa de elongación de la raíz como un indicador para la tolerancia a metales en las plantas (Ernst y col. 1992, Barcelo y Poschenrieder 1996). Sin embargo, aún no se han establecido de manera clara los mecanismos responsables que median la rápida inhibición del crecimiento observada en el sistema radicular frente a la intoxicación con metales. Para avanzar en el conocimiento en este aspecto se evaluó la respuesta a cadmio y cobre de la raíz primaria de trigo durante la fase de crecimiento quimioheterotrófico. En esta condición metabólica los efectos observados sobre el crecimiento no se desarrollarían asociados a una disminución de la tasa fotosintética, uno de los principales blancos de la acción de los metales, sino a alteraciones sufridas en los procesos de proliferación y/o expansión celular del RAM. Además se sumaron los tratamientos con metilviológeno, un conocido generador de anión superóxido, y peróxido de hidrógeno, con el objeto de evaluar si los efectos observados con los metales podrían estar mediados por EAO.

El trigo mostró una tolerancia al cadmio y el cobre similar a la observada en otros cultivos de producción mundial como arroz y maíz, además de otras especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* (Doncheva 1998, Jiang y col. 2001, Madejón y col. 2009, Lequeux y col. 2010, Petó y col. 2011).

De manera interesante, se observó un incremento del crecimiento radical a baja concentración de cobre ($1\ \mu\text{M}$). Esta respuesta ha sido documentada también en maíz (Jiang y col. 2001). La estimulación de una respuesta, como el crecimiento, puede deberse en primera instancia a cubrir la concentración del metal requerida

por el vegetal para su normal desarrollo. Sin embargo, este tipo de fenómeno, donde se observa una estimulación de la respuesta a bajas dosis, también se ha registrado en organismos vivos sometidos a tratamientos con dosis bajas de compuestos tóxicos. A este tipo de curva bifásica dosis-respuesta se la considera una respuesta adaptativa denominada hormesis (Calabrese 2005), y podría corresponderse con la respuesta observada para el cobre y el crecimiento de la raíz en plántulas de trigo.

Si bien el ingreso de los metales se lleva a cabo a través de la totalidad de la raíz, Piñeros y col. (1998) reportaron que el mayor ingreso de Cd en las raíces seminales de plantas de trigo de 4 días se concentra en el ápice de la raíz. Resultados similares pero respecto de la acumulación de cobre en raíz fueron observados en plantas de la especie *durum* (Sgherri y col. 2007), *aestivum* (Gajewska y Skłodowska 2010), en cultivares de maíz (Madejón y col. 2009) y en *Arabidopsis thaliana* (Lequeux y col. 2010). Un punto interesante es que a nivel del ápice de la raíz, la falta de banda de Casparry permite la carga directa de los metales al xilema mediante la vía apoplástica. Todo esto indica que el RAM es una de las zonas más activas en el ingreso de estos metales a la planta y por lo tanto más expuesta a sufrir los efectos tóxicos que éstos pueden provocar.

3.2. El balance redox en el ápice de la raíz

Las concentraciones de Cd^{2+} y Cu^{2+} que causaron una reducción en el crecimiento de la raíz también produjeron acumulación de EAO en el extremo de la misma, tal como fue detectado *in vivo* con las sondas fluorescentes. Resultados similares se han registrado en plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) expuestas a Cd^{2+} (Guan y col. 2009), o de arroz tratadas con Cu^{2+} (Thounaojam y col. 2012). De manera interesante, en la planta hiperacumuladora de cadmio *Thlaspi caerulescens* el crecimiento radicular se mantuvo en presencia de cadmio, pero con menores niveles de H_2O_2 (Boominathan y Doran 2003). En este contexto, el desequilibrio redox producido por la presencia de los metales es un fuerte indicio de la participación de las EOA en la detención del crecimiento observada en los tratamientos con metales.

En el caso del cobre, por ser un metal redox activo, puede catalizar de manera directa la formación de EAO (Aust y col. 1985). Pero además, Sgherri y col. (2007) trabajando en la raíz de plantas de *Triticum durum* propusieron que la producción temprana de EAO (particularmente el O_2^-) tendría un origen apoplástico a través de la NADPH oxidasa. Para el cadmio, que es un metal inactivo desde el punto de vista redox, el mecanismo que subyace a la acumulación de EAO en el extremo de la raíz parece tener numerosos orígenes. Por ejemplo, el incremento de EAO producido por Cd^{2+} se ha asociado con una disminución del sistema de defensa antioxidante en raíces de pino (Schützendübel y col. 2001) o en arveja (Rodríguez-Serrano y col. 2006). Pero por otro lado, en trigo de la especie *durum* tratado con cadmio, se detectó acumulación de EAO aún cuando se observó un aumento en el ápice de la raíz de los niveles de ascorbato, GSH y en las enzimas del ciclo ASC-GSH (Paradiso y col. 2008). También se ha relacionado el incremento de EAO durante el estrés por cadmio con la actividad de las enzimas productoras de las mismas en especies vegetales como alfalfa (Ortega-Villasante y col. 2007) y cebada (Tamás y col. 2010). En conclusión, el mecanismo que incrementa las EAO durante el estrés por Cd^{2+} parece depender de la especie vegetal, la concentración del metal y del tiempo de exposición (Benavides y col. 2005).

Uno de los principales blancos de acción de las EAO son las proteínas, teniendo como consecuencia la modificación covalente de los polipéptidos. En este sentido, el daño oxidativo a proteínas es generalmente considerado un indicador de estrés oxidativo (Pena y col. 2012). Las concentraciones de cadmio y cobre con capacidad de reducir el largo de la raíz y de inducir la acumulación de EAO aumentaron la oxidación general de proteínas en el ápice de la raíz, dando evidencias de la generación de estrés oxidativo. La carbonilación de proteínas en plantas inducida por cadmio y cobre ha sido informada con anterioridad (Romero-Puertas y col. 2002, Pena y col. 2006, Pena y col. 2007, Gajewska y Skłodowska 2010). Sin embargo, no se ha efectuado previamente una relación entre la oxidación de proteínas y la reducción del crecimiento inducida por el estrés por metales.

Si bien el estrés oxidativo podría conducir a la muerte celular, tal como se observa en la respuesta de hipersensibilidad durante la infección por patógenos (Mur y col. 2008), en este punto, cabe recordar que durante las condiciones experimentales ensayadas se mantuvo la viabilidad celular en el ápice de la raíz de trigo sometidas a estrés por cadmio, pero en el tratamiento con cobre se detectó alteración en la integridad de las membranas. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo y los obtenidos en cultivares de maíz con diferente tolerancia al cobre (donde la disminución elongación de la raíz y la pérdida de la integridad de la membrana no coinciden exactamente con la diferente sensibilidad a la presencia del metal, Madejón y col. 2009) sugieren que la inhibición de la elongación de la raíz inducida por cobre no es, o al menos no lo es exclusivamente, una consecuencia directa de la pérdida oxidativa de la integridad de las membranas y la consecuente muerte celular.

3.3. La proliferación y la expansión celular

Como primera evaluación del efecto de los tratamientos sobre el proceso de proliferación celular, uno de los dos componentes del crecimiento, se determinó el número y largo de las células en el ápice de la raíz, y se observó reducción de la zona de proliferación del RAM cuando se incluyó tanto 10 μM de Cd^{2+} o 10 μM de Cu^{2+} como las EAO en el medio de incubación.

Si bien en reportes previos se indica que el Cd^{2+} interfiere con la división celular en un cultivo celular de soja (Sobkowiak y Deckert 2003) e inhibe el índice mitótico en el meristema apical de raíces de trigo de la especie *durum* (Paradiso y col. 2008), no se han establecido los posibles mecanismos por los cuales ejerce estos efectos. De manera similar se demostró en tratamientos con Cu^{2+} una disminución del número de núcleos en fase S en el RAM de plantas de maíz (Doncheva 1998). Otro ejemplo es el demostrado con la variedad de maíz HS 16336 sensible al Al^{3+} , donde la exposición a este metal bloquea completamente la entrada de las células a la fase S en la parte central del RAM (Doncheva y col. 2005). En otro estrés como el salino también la zona meristemática de la raíz disminuyó en *Arabidopsis thaliana* (Burssens y col. 2000, West y col. 2004).

El fenotipo de RAM observado con los tratamientos de cadmio, cobre, MV y peróxido de hidrógeno es coincidente con el modelo propuesto por Potters y col. (2007, 2009) que postula que en condiciones subletales de estrés se produce una respuesta morfogénica (*stress-induced morphogenic response* SIMR) como parte de una estrategia general de aclimatación, donde el crecimiento vegetal es redirigido para disminuir la exposición al estrés. En este contexto, en este trabajo de Tesis se postula que las EAO podrían ser parte de un mecanismo general, como el sugerido por West y col. (2004), donde el estrés primero bloquea rápidamente la progresión del ciclo celular, presumiblemente para prevenir la entrada a estados donde la célula y su material genético son particularmente vulnerables al daño, y permitiendo de esta forma que el sistema de defensa celular sea activado.

Cada vez es más claro que la plasticidad en el desarrollo como respuesta al medio ambiente está unida a las EAO, las cuales forman parte de un módulo complejo de señalización que operan en la regulación del normal funcionamiento del RAM, y en estricta relación con el control hormonal del desarrollo de las raíces ejercidas por las auxinas, giberelinas y citoquininas, donde esta relación redox/hormona regularía la expresión génica (Pasternak y col. 2005, De Tullio y col. 2010). Sin embargo, aún es incompleta la información de la respuesta en condiciones de estrés.

En búsqueda de los intermediarios entre las EAO y la regulación génica, y en base a los datos obtenidos de carbonilación de proteínas, se estudió particularmente la ciclina D y la CDKA. El análisis de inmunotransferencia mostró que los niveles de proteína ciclina D y proteína CDKA permanecieron sin cambios en el extremo de la raíz de trigo durante los tratamientos con los metales y las EAO, pero se detectaron modificaciones postraduccionales de tipo oxidativas en ambas proteínas. La oxidación de proteínas se asocia con la pérdida de funcionalidad de las mismas, como se demostró con la inactivación enzimática debido a la carbonilación de estas moléculas (Nyström 2005, Møller y col. 2011). La ciclina D es un componente limitador de la velocidad para la activación de la vía de Rb-E2F responsable de la transición G1/S (Dewitte y col. 2007). Los resultados presentados muestran que la oxidación de proteínas ligadas al ciclo celular tiene

lugar de manera concomitante con una regulación negativa de algunos blancos transcripcionales de E2F como son *mcm2*, *rdr* y *pcna*, y donde no se modificó la transcripción de genes que se espera no sea alterada en respuesta a E2F, como la actina y tubulina. De esta forma, la pérdida de funcionalidad del complejo ciclina D-CDKA sería en parte responsable por la disminución en la proliferación celular. De manera que, aunque está ampliamente reconocido que las EAO son necesarias en la células durante el desarrollo de la semilla, la germinación y el crecimiento postgerminativo de la plántula (Bailly 2004, Causin y col. 2012), es necesaria una delicada regulación para evitar la generación de estrés oxidativo. Como ha sido sugerido por Rinalducci y col. (2008), los resultados presentados en este trabajo de Tesis sugieren que la modificación postraducciona oxidativa producida durante el estrés celular podría ser de significancia en la fisiología de respuesta al estrés y no meramente una consecuencia secundaria del mismo.

Los resultados obtenidos de niveles de expresión de la proteína y la oxidación del proteasoma 20S concuerdan con resultados previos del laboratorio (Pena y col. 2007) que demuestran que existe un umbral de respuesta del proteasoma al estrés abiótico mediado a través de la modificación oxidativa del proteasoma en sí. En trigo, la oxidación del proteasoma podría asociarse con la acumulación concomitante de proteínas oxidadas.

Por otro lado, aunque el proceso de ubiquitinación total no parece alterado por los tratamientos oxidantes, la conjugación con Ub de las ciclina D y la CDKA disminuyó con estos tratamientos. Un posible mecanismo que explicaría este resultado involucra los residuos de lisina (K). La ubiquitina se une a los grupos ϵ -amino de la lisina en las proteínas blanco, pero al mismo tiempo la lisina es uno de los aminoácidos más comúnmente carbonilado (Møller y col. 2011). De esta forma, la modificación oxidativa de los residuos de lisina podría directamente alterar la conjugación de la proteína con Ub. Esto puede significar un interesante mecanismo donde una modificación postraducciona oxidativa regula otra modificación postraducciona como la ubiquitinación.

Además de la división celular, el otro sistema efector involucrado en el crecimiento de un órgano vegetal es la expansión celular (Woolhouse, 1983). Las

expansinas son proteínas localizadas en la pared celular que tienen la capacidad de inducir de inmediato la extensión de la pared. Los niveles de expresión de las expansinas se incrementaron en diferentes especies vegetales en respuesta al estrés ambiental, como calor, sombreado, condiciones anaeróbicas e infecciones de patógenos (Lü y col. 2013). Basado en el trabajo de Lin y col. (2005) quienes aislaron y caracterizaron 18 genes que codifican para α y β expansinas de trigo, se seleccionaron cinco genes, TaEXPA5, TaEXPA6, TaEXPA8, TaEXPB8 y TaEXPB10, que mostraban altos niveles de expresión en la raíz, pero bajos niveles en hojas y vaina. En los tratamientos con cadmio y cobre (aún a bajas concentraciones), con MV y peróxido se observó un complejo patrón de expresión en los transcriptos analizados. De esta complejidad, sumado al número de genes que codifican expansinas, surge la dificultad de determinar el significado funcional de cada uno. En trigo, si bien aún no se ha relacionado a cada expansina con la fisiología normal de la planta, la sobreexpresión de TaEXP23 en tabaco produjo un acelerado crecimiento de las hojas y los internodos en estadios de desarrollo temprano (Xing y col. 2009), y además incrementó la tolerancia al estrés (Li y col. 2011, Han y col. 2012). De manera interesante, la misma expansina expresada en *Arabidopsis thaliana* bajo un promotor inducible por estrés no tuvo efectos sobre el crecimiento, pero si le confirió a la planta tolerancia al estrés (Li y col. 2013). Por otro lado, la sobreexpresión de la EXPA1 de *Brassica juncea* (BjEXPA1) en plantas de tabaco, generó plantas susceptibles al estrés por cadmio, mientras que la actividad de GUS bajo el promotor de dicha expansina resultó en inducción de la transcripción producida por giberelinas y auxinas exógenas, pero inhibida por ácido abscísico, cadmio y polietilenglicol 6000 (Sun y col. 2011). Todo esto indicaría que si bien las expansinas poseen un mecanismo de acción similar, modificando la plasticidad de la pared celular, no poseen entre ellas funciones redundantes, donde algunas parecen desarrollar mejor su actividad en la fisiología normal y otras podrían estar más ligadas a la respuesta al estrés. Lizana y col. (2010) proponen que el aumento de la expresión de un gen particular de expansinas en la planta podría reflejar interacciones específicas entre la proteína y la composición de la pared celular, que se modifica en cada tejido, órgano y estadio de desarrollo de la planta. Por

ejemplo, la cantidad y tipo de ácidos fenólicos (Sasayama y col. 2011), o la abundancia relativa del tipo de polisacáridos (Lizana y col. 2010) modifican la susceptibilidad de la pared celular a las expansinas.

La acumulación de prolina aparece como una defensa adicional para prevenir el daño oxidativo durante el estrés (Thounaojam y col. 2012). Recientemente Wen y col. (2013) demostraron que el aumento del contenido de prolina durante el estrés por cobre en plantas de maíz se podría relacionar con una activación secuencial de las dos vías de origen de la prolina en plantas: la del glutamato y la de la ornitina, con una reducción en la actividad de prolina dehidrogenasa.

Capítulo 5

Restricción hídrica

Resultados

1. Efecto del déficit hídrico sobre los parámetros de crecimiento

1.1. Índice de germinación

Se determinó el índice de germinación de las semillas de trigo como un parámetro de evaluación del efecto que tiene sobre este proceso el incremento en el potencial osmótico del medio de incubación. Luego de 4 días de imbibición con concentraciones crecientes de PEG se observó que hasta un Ψ_w de -0,6 MPa no afectó significativamente la germinación. Pero, a partir de este último valor, el índice disminuyó, restringiéndose totalmente el proceso de germinación cuando el Ψ_w fue de -1,8 MPa, situación para la cual no se observó germinación en las semillas tratadas (Figura 5.1).

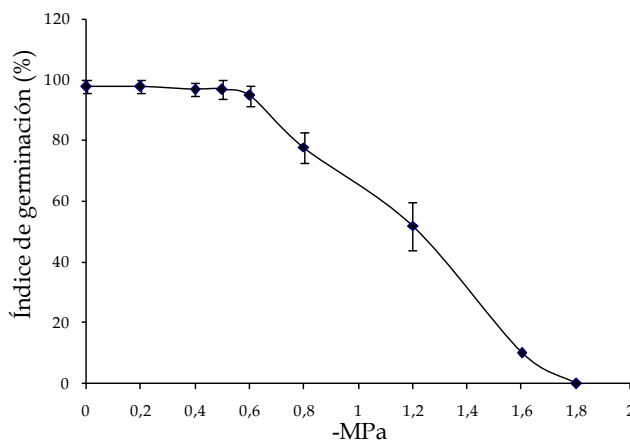


Figura 5.1. Índice de germinación (IG). Las semillas de trigo fueron embebidas durante 4 días en soluciones de concentraciones crecientes de PEG6000, el IG se calculó según lo descrito en Materiales y métodos. Los valores representan la media \pm SEM.

1.2. Longitud de la raíz y del coleoptile

Aunque las semillas germinaron, la disminución del Ψ_w redujo el crecimiento de las plántulas de trigo, evaluado como modificación de la longitud del coleoptile y de la raíz principal durante los primeros 4 días después de la imbibición. La mayor concentración de PEG utilizada generó en el coleoptile una disminución de la elongación del 80%, mientras que esta restricción en el largo de la raíz fue del 61%, respecto de sus respectivos controles, el día 4 postimbibición (Figura 5.2)

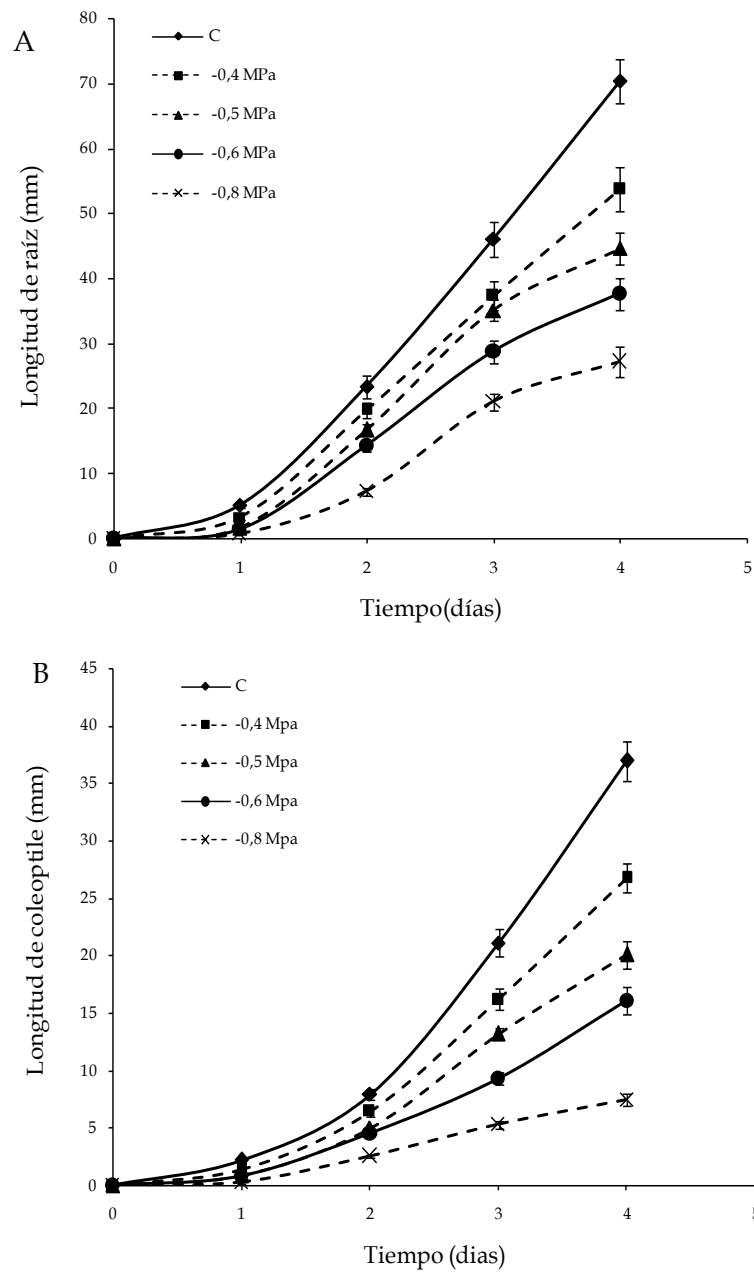


Figura 5.2. Longitud (A) de la raíz y (B) del coleoptile de plántulas incubadas en soluciones con concentraciones crecientes de PEG6000, según lo descrito en Materiales y métodos. Los valores representan la media \pm SEM.

La Fotografía 5.1 muestra la diferencia de crecimiento entre las plántulas crecidas en situación control y las sometidas a concentraciones crecientes de PEG, determinada el día 4 postimbibición.



Fotografía 5.1. Efecto del déficit hídrico luego de 4 días postimbibición, de izquierda a derecha se muestra una plántula representativa del control (-0,03 MPa) y de los tratamientos correspondientes a -0,4, -0,5, -0,6 y -0,8 MPa.

Por otro lado, al analizar las respuestas de la longitud de raíz y del coleoptilo en cada tiempo en relación a la concentración de PEG utilizada se observa que la relación ajusta a un polinomio de primer grado ($y=ax+b$). El coeficiente de correlación de Pearson entre la concentración de PEG y la longitud analizado día por día muestra un valor negativo, aproximado a una correlación inversa entre las longitudes de la raíz y del coleoptilo respecto de la concentración de PEG en el medio de incubación, indicando una dependencia directa entre ambos parámetros (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Coeficiente de correlación de Pearson entre los tratamientos a un mismo tiempo para raíz y coleoptilo.

Tiempo (días)	1	2	3	4
Raíz	-0,99	-0,95	-0,99	-0,99
Coleoptile	-0,99	-0,97	-0,98	-0,99

La elongación de la raíz a -0,6 MPa el día 3 alcanzó un largo similar al de las raíces creciendo a -0,03 MPa durante el día 2. Para evaluar si los cambios observados son debidos a un retraso en el tiempo de crecimiento o existen diferencias metabólicas en las plántulas tratadas, se seleccionó este Ψ_w y ambos tiempos de exposición para continuar los experimentos.

Para estos tiempos (entre el día 2 y 3 después de la imbibición), el cálculo de la velocidad absoluta de elongación (VAE) en raíz fue de 23 mm d⁻¹ para las plántulas control y decreció 40% (14 mm d⁻¹) para las tratadas con PEG (-0,6 MPa). En las mismas condiciones de cultivo, la VAE del coleoptile, de 13 mm d⁻¹ para las plantas control, disminuyó a 5 mm d⁻¹ en las tratadas, lo que equivale a una reducción del 62% (Figura 5.2).

1.3. Análisis de la biomasa

La biomasa del sistema radicular, determinada como PF, disminuyó aproximadamente 45% en las plántulas crecidas en -0,6 MPa de Ψ_w respecto de las controles, tanto el día 2 como el 3. Al mismo tiempo, el PS se mantuvo con valores similares en ambas condiciones, control y restricción de agua, para ambos días. En el coleoptile, por su parte, el PF y el PS decrecieron un 67% y un 43% respectivamente, en plántulas tratadas al día 2, disminuyendo aún más para el día 3 (74% y 56% respectivamente). Bajo condiciones de déficit hídrico hubo un incremento en la relación raíz/coleoptile, tanto para PF como PS, comparadas con las plántulas crecidas en capacidad de campo (control) (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Efecto de la restricción hídrica sobre peso fresco (PF) y peso seco (PS) de la raíz y el coleoptile. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). El PF y el PS se expresan como mg por planta.

	Raíz		Coleoptile		Relación raíz/coleoptile	
	C	T	C	T	C	T
Día 2						
PF	12,0 ± 0,2a	6,50 ± 0,1b	10,2 ± 1,17a	3,40 ± 0,1b	1,2	1,9
PS	0,69 ± 0,02a	0,64 ± 0,01a	1,02 ± 0,04a	0,58 ± 0,01b	0,7	1,1
Día 3						
PF	23,6 ± 0,4a	13,1 ± 0,3b	27,1 ± 0,5a	6,90 ± 0,2b	0,9	1,9
PS	1,73 ± 0,03a	1,65 ± 0,02a	2,12 ± 0,08a	0,93 ± 0,02b	0,8	1,8

Los valores representan la media ± SEM. Diferentes letras entre columnas, para un mismo tejido, indican diferencias significativas ($p < 0,01$) de acuerdo al test de Tukey ($n = 40$).

A partir de los valores de biomasa se estimó la velocidad relativa de crecimiento (VRC) para la raíz y el coleoptile. La VRC calculada en la raíz, tanto en base al PF como al PS, no se afectó en las plantas tratadas respecto de las plantas

control, mientras que en el coleoptile, la VRC fue significativamente menor en los tratados con respecto al control. En la Figura 5.3 se muestra la VRC calculada en base a la biomasa fresca.

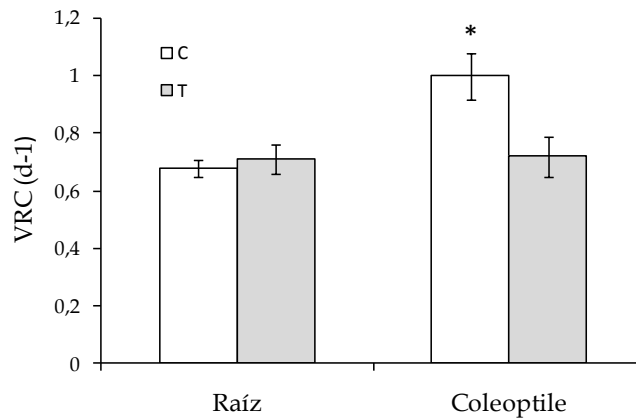


Figura 5.3. Efecto del déficit hídrico sobre la velocidad relativa de crecimiento (VRC) calculada en base al PF. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

Además, con los valores obtenidos de PF y PS se calculó el contenido de agua (CA) para cada caso y cuyos resultados se grafican en la Figura 5.4. Tanto en raíz como en coleoptile el CA disminuyó en las plántulas sometidas a déficit hídrico respecto de los controles.

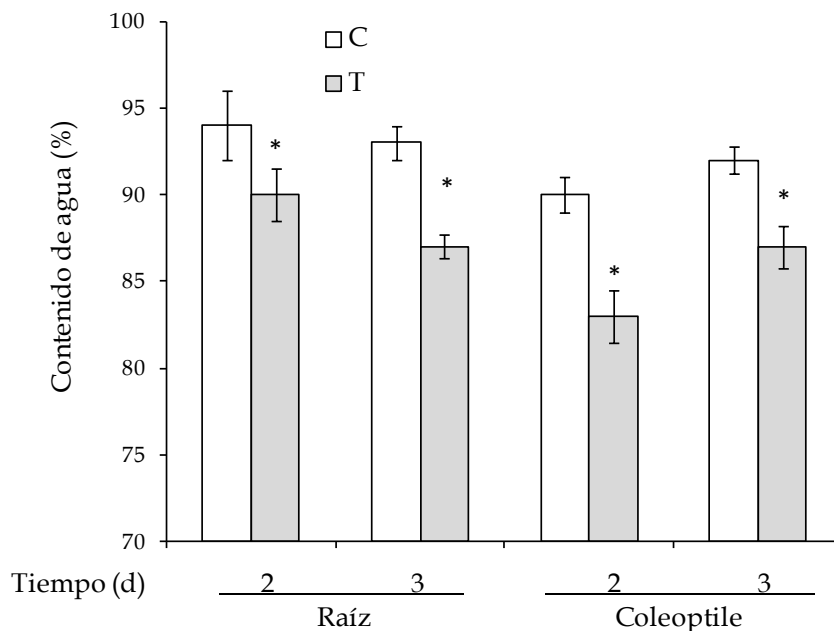


Figura 5.4. Efecto del déficit hídrico sobre el contenido de agua en raíz y coleoptile, expresado en relación al peso fresco. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

El agua del tejido se puede relativizar también por gramo de biomasa seca producida (PF-PS/PS), o sea la cantidad de agua que incorporó cada tejido por gramo de biomasa seca (Tabla 5.3). En este caso se puede apreciar que las plántulas mantenidas en capacidad de campo fueron capaces de incorporar mucha más agua que las sometidas a déficit hídrico para una misma cantidad de masa seca. Las diferencias observadas fueron del 80 y 83% para los días 2 y 3 respectivamente en la raíz y de 87 y 84 % para el coleoptile a favor de las hidratadas.

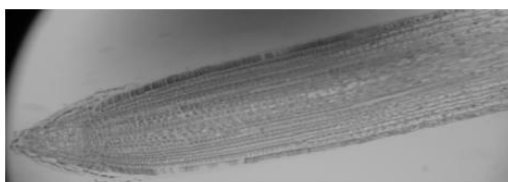
Tabla 5.3. Efecto del déficit hídrico sobre el contenido de agua en raíz y coleoptile en función del peso seco. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T).

	Raíz		Coleoptile	
	C	T	C	T
Día 2	16,4a	9,1b	9,1a	4,8b
Día 3	12,6a	6,9b	11,8a	6,4b

Los valores representan la media \pm SEM. Diferentes letras entre columnas, para un mismo tejido, indican diferencias significativas ($p < 0,01$) de acuerdo al test de Tukey

1.4. Evaluación del largo de células en el RAM

En un corte longitudinal del ápice de la raíz analizado en microscopio óptico no se observaron diferencias morfológicas en la zona proliferativa del RAM entre las plántulas crecidas en un Ψ_w similar a la capacidad de campo y el tratamiento de -0,6 MPa a los 3 días de imbibición. En la Fotografía 5.2 se muestra el ápice radicular de una planta control.



Fotografía 5.2. Corte longitudinal del ápice de la raíz de trigo de plantas control fotografiado en el microscopio óptico (100X)

El número total y el largo promedio de las células de la corteza registrado entre el centro quiescente (QC) y el comienzo de la zona de rápida elongación se mantuvieron sin cambios en el ápice de la raíz principal de las plántulas tratadas con 22,2% de PEG respecto de las plantas control (Figura 5.5).

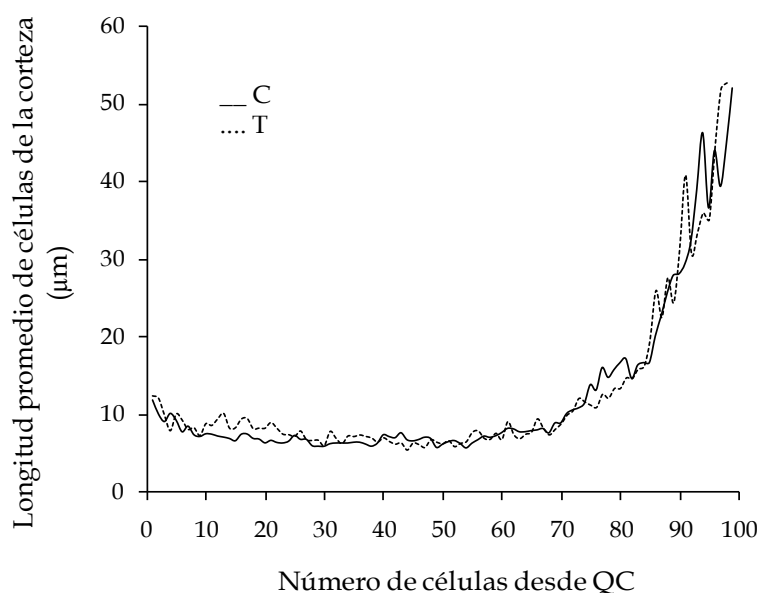


Figura 5.5. Largo de las células de la corteza en diferentes zonas del meristema de la raíz. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). El largo y número de células fue determinado utilizando el programa Image Pro Plus.

1.5. Acumulación de transcritos relacionados con proteínas del ciclo celular

Con el objetivo de conocer si el proceso de disminución en el crecimiento en raíces de plántulas sometidas a estrés hídrico comparadas con plántulas en condiciones óptimas de humedad estuvo asociado a un decrecimiento en la tasa de división celular, se analizó el nivel de expresión de genes diana del sistema CycD-Rb-E2F en la zona del meristema apical de la raíz.

Cuando se analizó el nivel de transcritos de marcadores relacionados con la fase de transición del ciclo celular G1-S, no se observaron diferencias significativas en los genes *mcm2*, *rdr* y *pcna*; entre las plantas crecidas en capacidad de campo (C) y las crecidas con restricción hídrica (T), en la región apical de la raíz (5mm) (Figura 5.6).

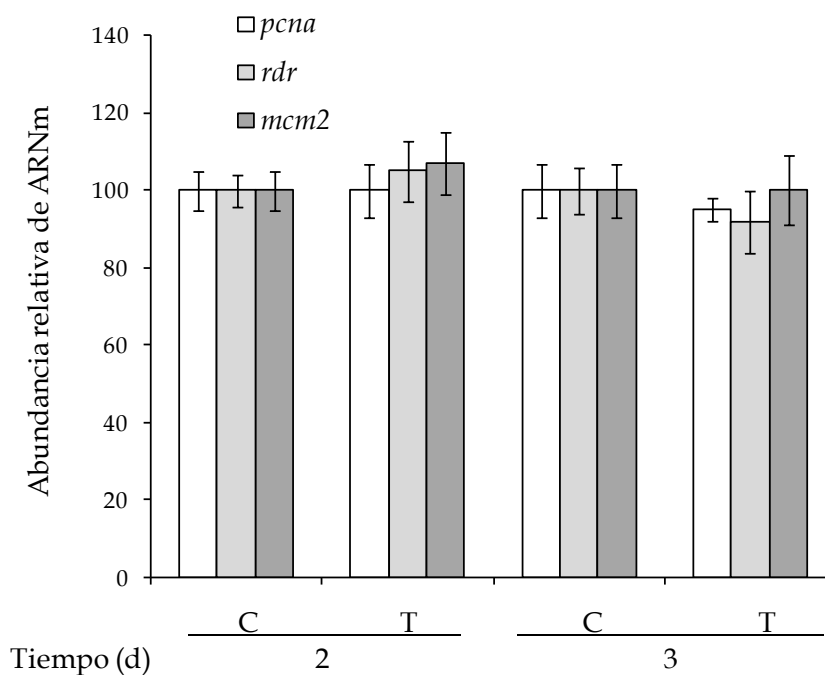


Figura 5.6. Efecto de la restricción hídrica sobre el nivel de transcritos de algunos genes blancos de Rb/E2F. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). La normalización se realizó asumiendo 100 el valor control. Los valores representan la media \pm SEM.

1.6. Acumulación de transcritos relacionados con proteínas de la pared celular

El análisis del nivel de transcritos de cinco genes de expansinas (*TaEXPA5*, *TaEXPA6*, *TaEXPA8*, *TaEXPB8* y *TaEXPB10*) reveló que la restricción hídrica reguló de manera positiva la expresión de estos genes (Figura 5.7). Mientras que el nivel de transcripto correspondiente a la *EXPB8* tuvo su mayor incremento el día 2 postimbibición, la *EXPA6* mantuvo elevados niveles en ambos tiempos analizados en las raíces tratadas respecto de las plantas control.

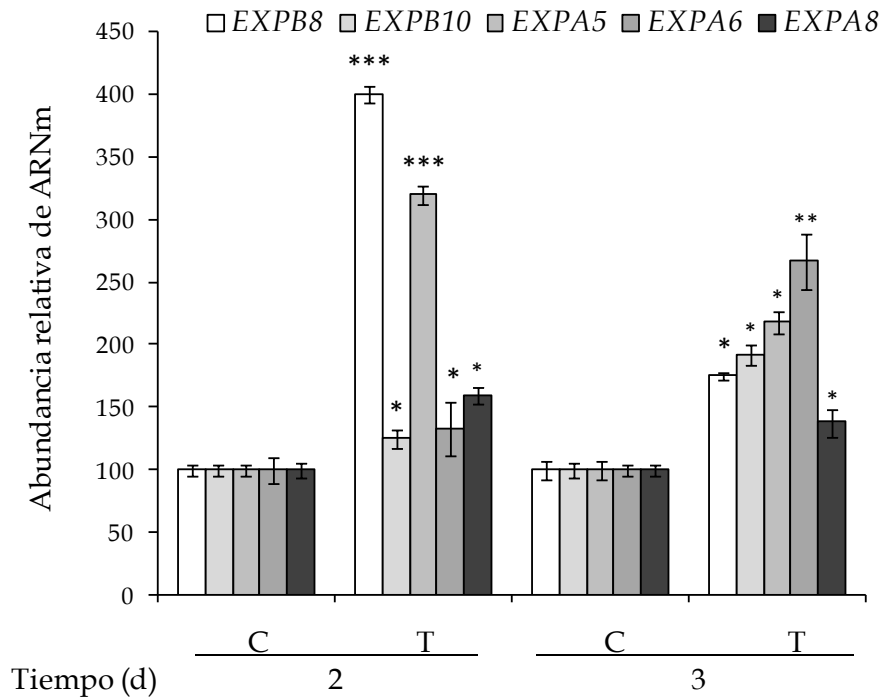


Figura 5.7. Efecto de la restricción hídrica sobre el nivel de transcritos de algunos genes de expansinas. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de $-0,03$ MPa (3,4% p/v PEG) (C) o $-0,6$ MPa (22,2% p/v PEG) (T). La normalización se realizó asumiendo 100 el valor control. Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ según el Test de Tukey.

2. Efecto de la restricción hídrica sobre el contenido de proteínas solubles

El contenido de proteínas solubles totales se incrementó significativamente en las plántulas sometidas a restricción hídrica respecto de las plantas controles cuando este parámetro se normalizó con el peso fresco (Figura 5.8A). Pero, cuando el nivel de proteínas solubles totales se calculó en función del peso seco, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control en ninguno de los tejidos (Figura 5.8B).

El incremento en la concentración de proteínas, calculadas respecto del peso fresco, fue proporcional a la pérdida de agua calculada en las plántulas crecidas bajo restricción de agua versus las controles (44% en raíz y 55% en coleoptile), excepto en el día 3 en coleoptile, donde el aumento (112%) excedió la pérdida de agua.

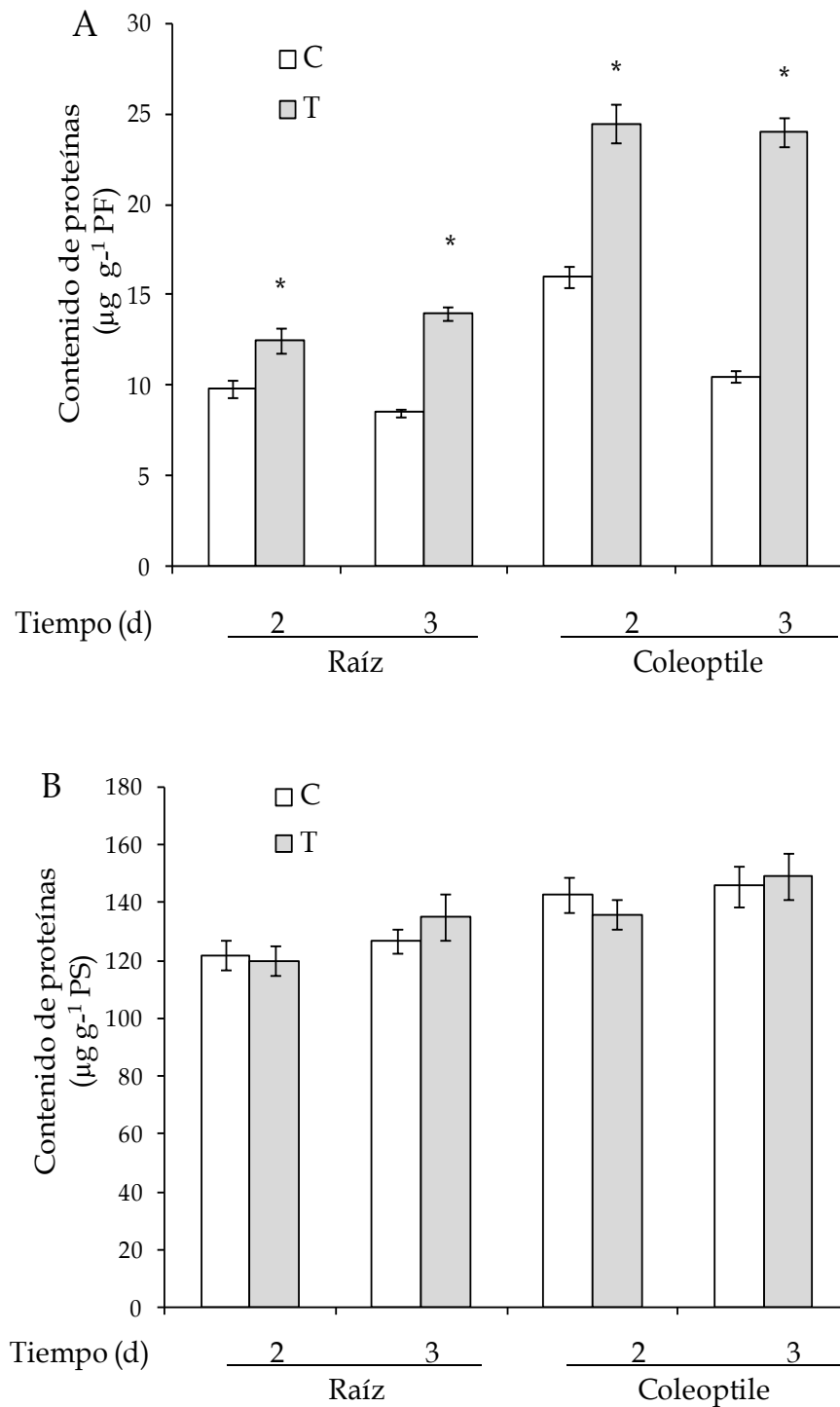


Figura 5.8. Contenido de proteínas solubles totales, expresadas en función de gramo (A) peso fresco y (B) peso seco. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de $-0,03$ MPa (3,4% p/v PEG) (C) o $-0,6$ MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control $*P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

3. Asociación entre el estrés hídrico y el balance redox.

3.1. Determinación de las especies activas del oxígeno y la muerte celular

Para evidenciar la formación de EAO en la raíz se realizaron tinciones con bencidina, para peróxido de hidrógeno y azul de nitrotetrazolio para anión superóxido. Ambas coloraciones resultaron sin diferencias entre las raíces provenientes de plántulas sometidas a restricción hídrica y las de plantas control (no se muestran las fotografías).

Similar resultado se determinó con el azul de Evans, utilizado para evaluar viabilidad celular, donde los valores obtenidos para las plantas sometidas a -0,6 MPa no mostraron diferencias significativas con las provenientes del medio de incubación control (-0,03 MPa) (no se muestran los datos).

3.2. Evaluación de la peroxidación lipídica y del daño oxidativo a proteínas

Se analizó el nivel de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como una medida de la peroxidación lipídica. Como se observa en la Figura 5.9 en las condiciones ensayadas la restricción hídrica no generó un incremento significativo del daño oxidativo a lípidos respecto del determinado en las plantas control. Este resultado está en concordancia con el obtenido con el azul de Evans, donde no se detectó pérdida de la integridad de la membrana.

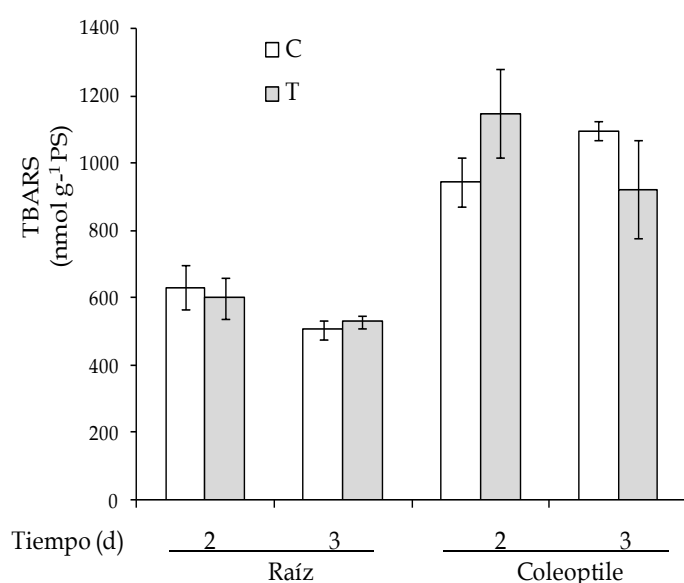


Figura 5.9. Efecto de la restricción hídrica sobre el daño oxidativo a lípidos. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM.

La restricción hídrica no modificó la acumulación ni el patrón de proteínas carboniladas analizadas en Western blot, utilizando anticuerpo primario anti-DNP (no se muestran resultados).

4. Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante

4.1. Actividad superóxido dismutasa, guayacol y ascorbato peroxidasas

Las plántulas sometidas a restricción hídrica mostraron, tanto para la raíz como para el coleoptile, un incremento significativo de la actividad de SOD absoluta y específica (Figura 5.10). En raíz el incremento en la actividad específica en las plantas sometidas a déficit hídrico alcanzó valores de 58% y 62% para los días 2 y 3, respectivamente, sobre el valor control. Por su parte en coleoptile el incremento para los mismos tiempos fue del 36% y 22%, respectivamente.

Similar a los datos de SOD, la actividad absoluta de la guayacol peroxidasa (GPX) aumentó tanto en raíz como en coleoptile, en las plantas bajo estrés hídrico respecto de las control (26% y 37% para día 2 y 3 en raíz y 76% y 94% para iguales tiempos en coleoptile). Sin embargo, esta diferencia de actividad no es significativa cuando el análisis se realiza sobre la actividad específica (Figura 5.11).

A nivel de raíz, la actividad absoluta de ascorbato peroxidasa (APX) de las plántulas sometidas a restricción hídrica no mostró diferencias significativas con los valores obtenidos en las plantas control. Sin embargo, se observó una disminución significativa en las raíces de plantas sometidas a estrés cuando la actividad se normaliza por el contenido de proteínas, 35% y 62% para los días 2 y 3 respectivamente, en relación al control (Figura 5.12).

En el coleoptile, tanto la actividad absoluta como la específica mostraron reducción de su valor en las plantas crecidas bajo restricción hídrica. Para el caso de la actividad específica la reducción alcanzó 46% y 61% para los días 2 y 3, respectivamente (Figura 5.12).

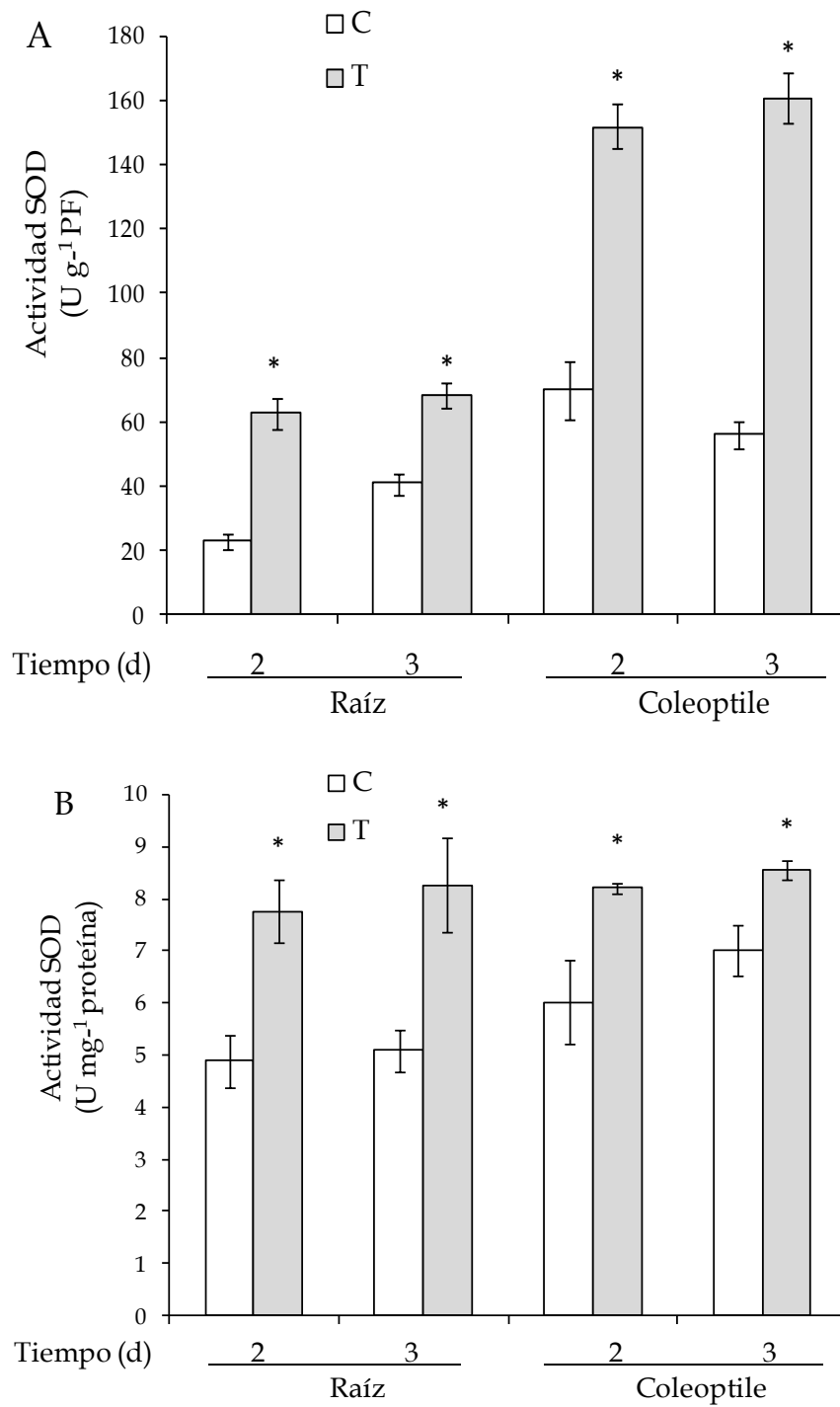


Figura 5.10. Restricción hídrica y actividad de superóxido dismutasa (SOD) (A) absoluta y (B) específica. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

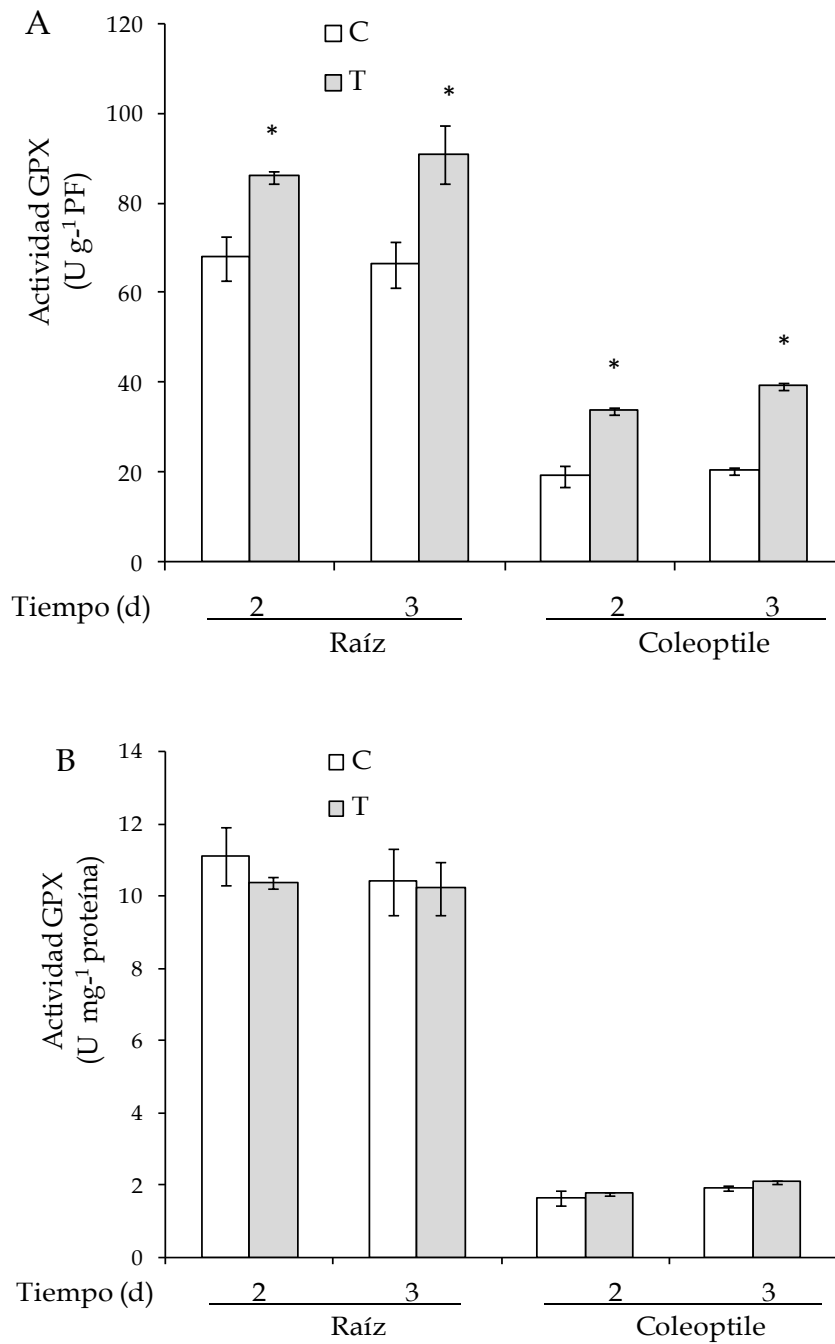


Figura 5.11. Restricción hídrica y actividad de guayacol peroxidasa (GPX) (A) absoluta y (B) específica. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

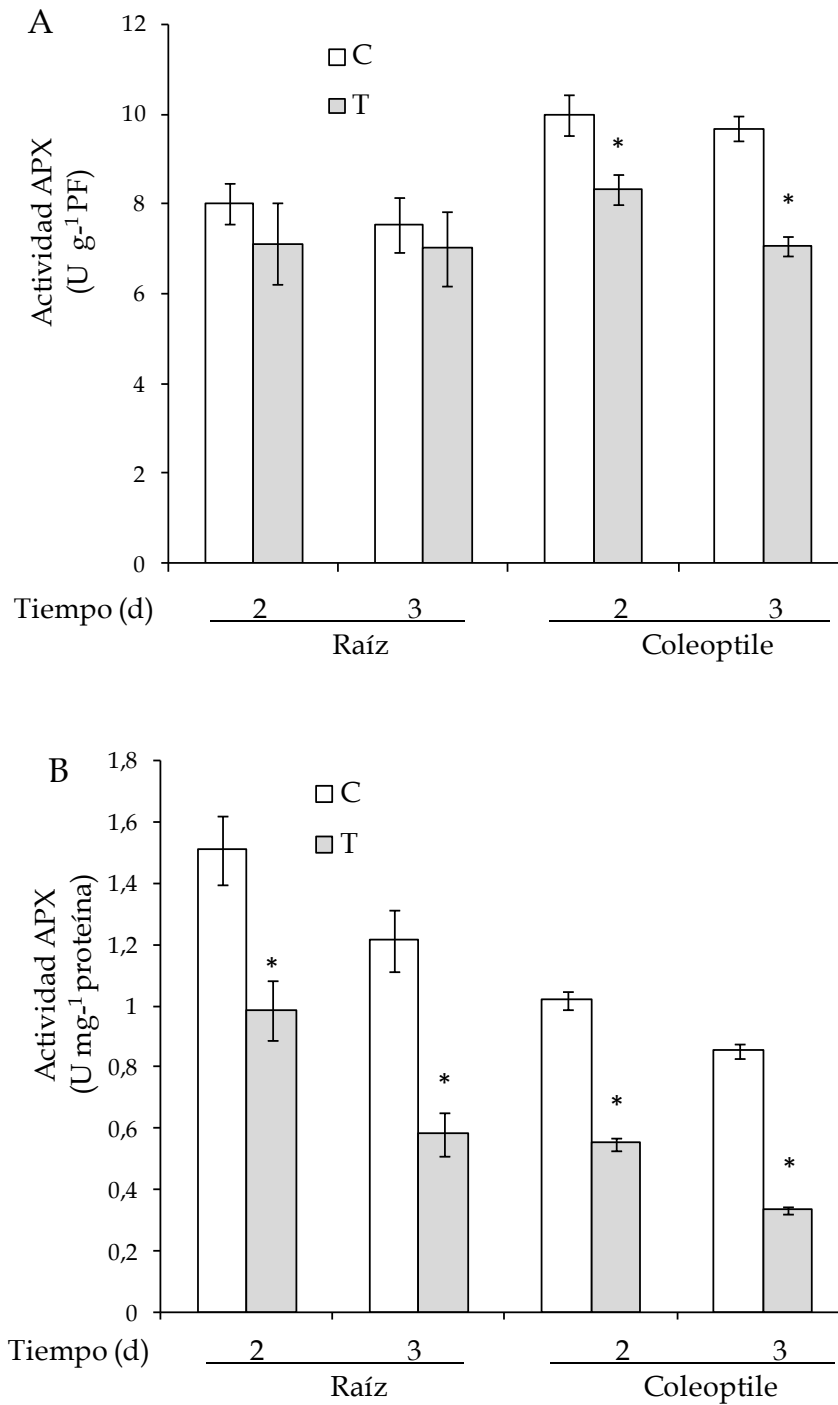


Figura 5.12. Restricción hídrica y actividad de ascorbato peroxidasa (APX) (A) absoluta y (B) específica. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

4.2. Estudio de la enzima catalasa: zimograma, actividad absoluta y específica

El zimograma de la actividad de CAT mostró una banda representativa de la actividad, la cual se corresponde a una masa molecular aproximada de 240 KDa y una movilidad electroforética comparable con la de la catalasa de origen de hígado bovino. La banda de actividad fue eliminada cuando el gel fue previamente incubado con 3-AT. En la Figura 5.13 se muestran fotografías representativas de los resultados observados.

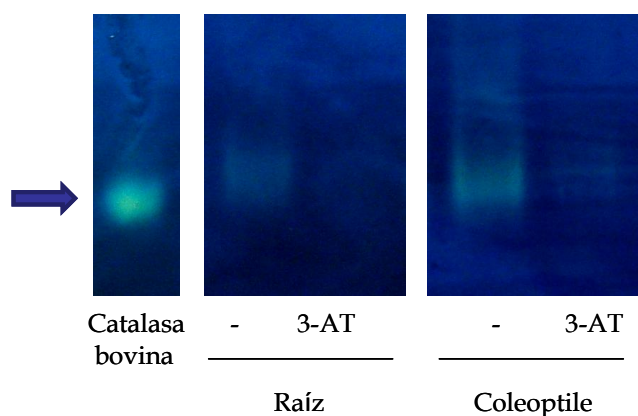


Figura 5.13. Zimograma de la enzima catalasa realizado en un PAGE nativo según lo descrito en Materiales y métodos. 3-AT = aminotriazol.

El déficit hídrico incrementó de manera significativa la actividad absoluta (133% y 100%) y específica (56% y 43%) de la CAT en el tejido radicular para los días 2 y 3 respectivamente, en las plantas sometidas a restricción de agua respecto de las plantas control (Figura 5.14).

En el coleoptile la actividad absoluta de CAT incrementó su valor el día 2 en las plantas crecidas bajo restricción hídrica (67%) y el día 3 (24%). Sin embargo el patrón de respuesta cuando se compara la actividad específica es diferente, permaneciendo el valor similar al control el día 2 (incremento del 10%), pero decayendo el 44% el 3 día postimbibición en las plantas estresadas respecto de las plantas control (Figura 5.14).

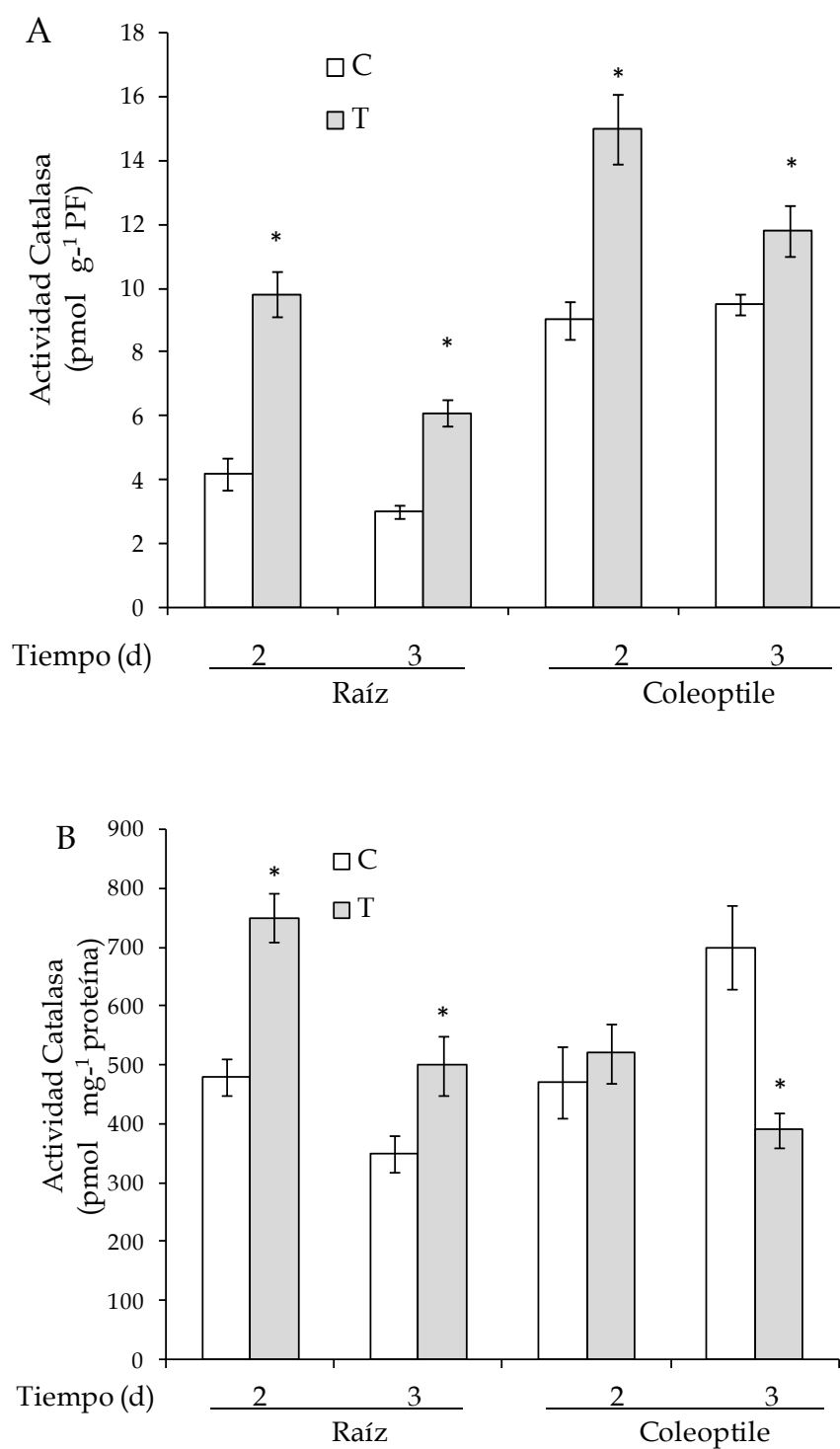


Figura 5.14. Restricción hídrica y actividad de catalasa (A) absoluta y (B) específica. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

4.3. Cuantificación del nivel de transcritos de catalasa

En los tejidos de la raíz, la abundancia de transcritos de *cat1* se mantuvo constante para control y plantas sometidas a déficit de agua a lo largo del tiempo (Figura 5.15). Por otro lado, el nivel de transcritos de *cat2* se incrementó en este tejido como consecuencia del déficit hídrico. La respuesta de *cat2* es coincidente con lo observado en la actividad específica de catalasa (Figuras 5.14B y 5.15B).

En el coleoptile, el comportamiento de acumulación de ARNm para ambos genes fue diferente a la respuesta detectada en raíz. En este caso, los niveles de transcritos de *cat1* se incrementaron significativamente a lo largo del tiempo (Figura 5.15A), tal como ocurrió con la actividad específica de catalasa (Figura 5.14B), cuando la plántula creció en condiciones de capacidad de campo. Pero cuando fue sometida a restricción hídrica, este incremento en *cat1* no se verificó. Al analizar el nivel de transcritos de *cat2*, los cambios en coleoptile no fueron significativos (Figura 5.15B).

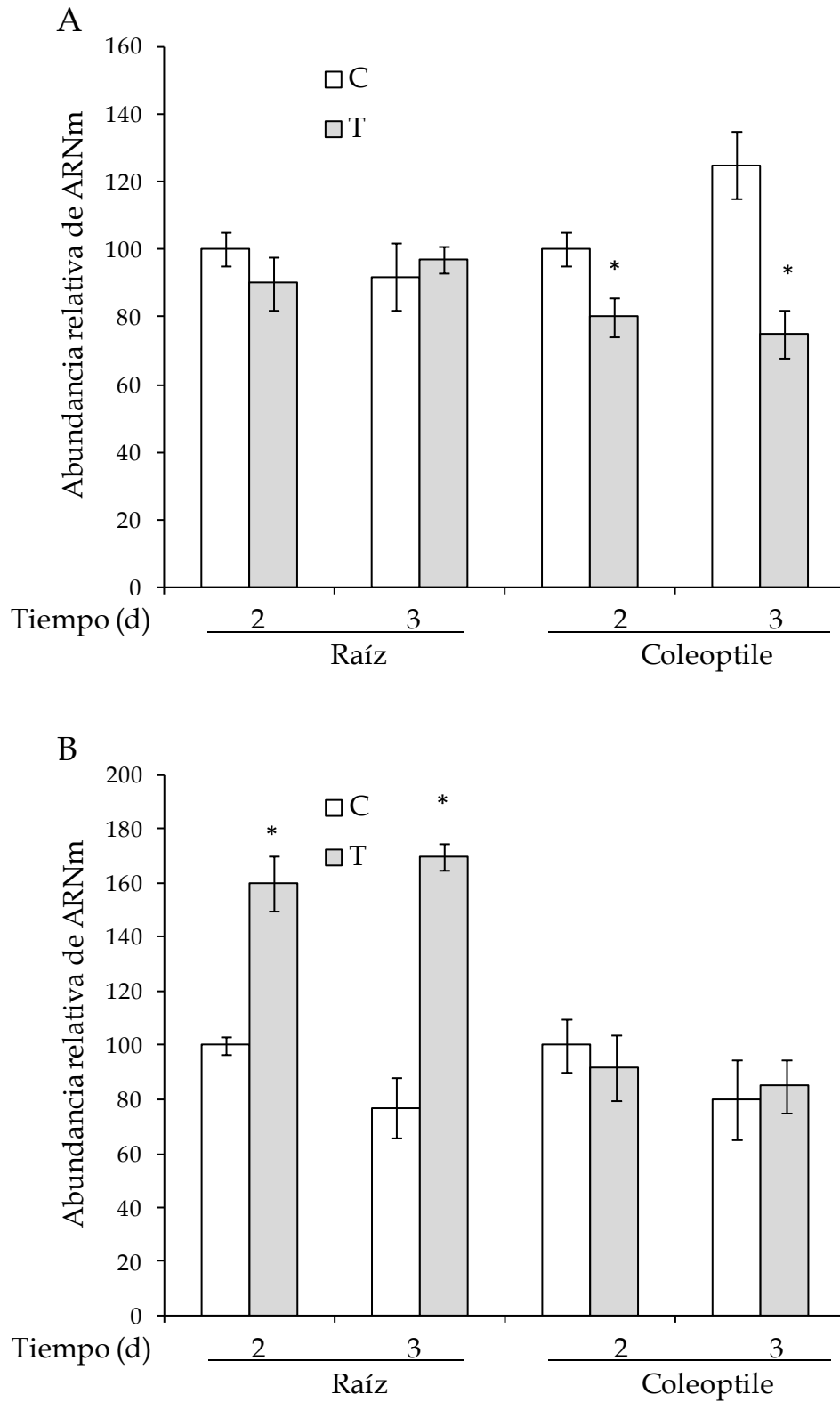


Figura 5.15. Efecto de la restricción hídrica sobre el nivel de expresión de los genes (A) *cat1* y (B) *cat2* en raíz y coleoptile de plántulas que germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Las RT-PCR fueron realizadas como se describe en Materiales y métodos. Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

5. Relación entre el déficit hídrico y la producción de ajuste osmótico

5.1. Análisis de la osmolalidad

La determinación de la osmolalidad de una solución es un parámetro de la concentración de solutos totales (osmolitos) en la misma. En el caso de utilizar un disolvente polar como el agua estimará a todos los compuestos iónicos y moléculas polares solubles. Durante el tratamiento con PEG6000 la osmolalidad total de los tejidos se incrementó significativamente respecto del valor control tanto en la raíz como el coleoptile (Figura 5.16). Cuando se determinó la osmolalidad inicial, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos indicando que no existió un daño a la membrana plasmática que permitiera la salida de osmolitos.

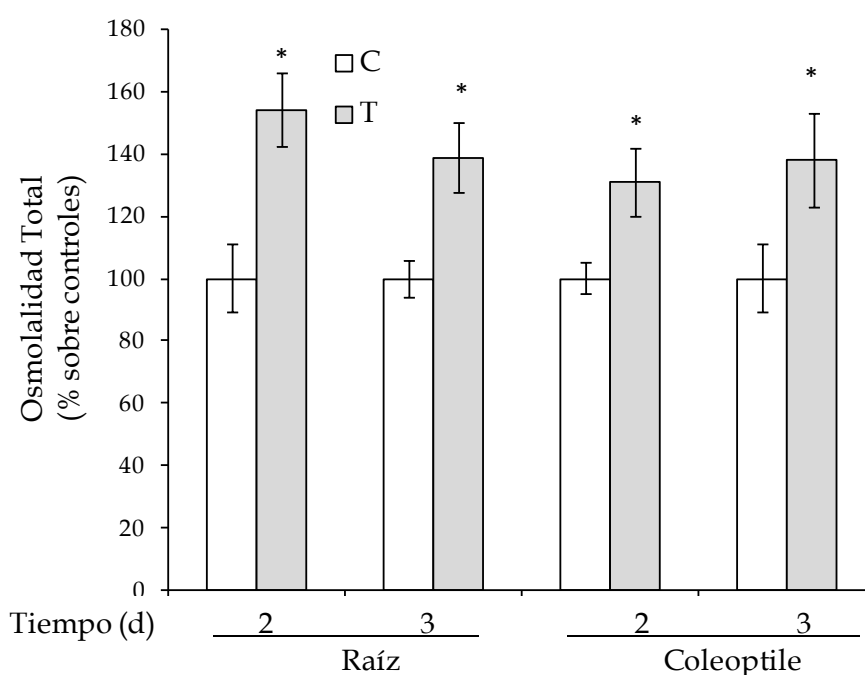


Figura 5.16. Osmolalidad total en raíz y coleoptile expresados en porcentaje respecto a osmolalidad de cada control. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

5.2. Análisis de la conductividad

La determinación de la conductividad de una solución es un parámetro de su contenido iónico. Como se ve en la Figura 5.17, tanto en raíz como en el coleoptile

este valor aumenta en las plántulas sometidas a estrés hídrico en relación a los respectivos controles.

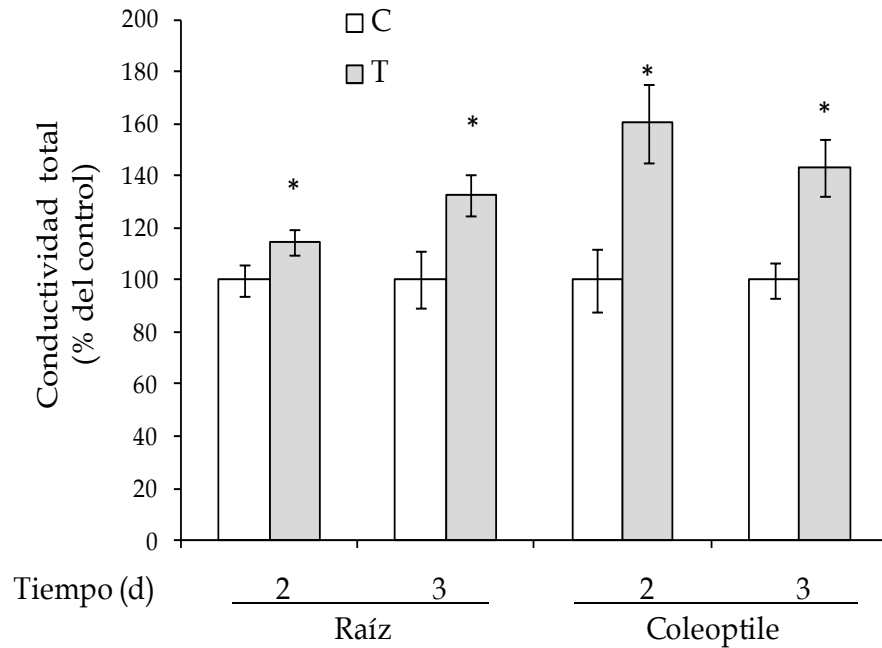


Figura 5.17. Conductividad total en raíz y coleoptile expresadas en porcentaje respecto a conductividad de cada control. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

Cuando se calculó la permeabilidad relativa de la membrana, no se observaron diferencias significativas al comparar control versus tratado para días 2 y 3, tanto para raíz como para coleoptile (Figura 5.18).

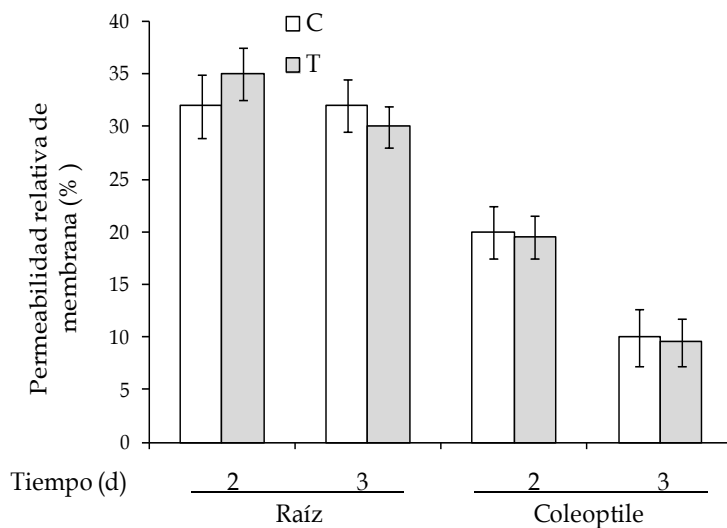


Figura 5.18. Permeabilidad relativa de la membrana en raíz y coleoptile. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) (C) o -0,6 MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM.

5.3. Modificaciones en el contenido de prolina e hidratos de carbono solubles

El contenido de prolina, normalizando su concentración tanto por peso fresco como por peso seco (Figura 5.19 A y B), se incrementó significativamente tanto en la raíz como en el coleoptile en los tratamientos con PEG6000 respecto del valor control.

Al analizar este resultado por gramo de peso fresco, el aumento determinado el día 2 en el coleoptile fue del 425% y para 3 días del 138%. En raíz este aumento fue del 90% al segundo día y del 117% para el día 3 después de la imbibición (Figura 5.19 A). Por gramo de peso seco, los valores de incremento en el contenido de prolina se encontraron para coleoptile en 224% para los 2 días de tratamiento y del 46% para el día 3. En cuanto a la raíz, los aumentos fueron del 39% y 38%, respectivamente, para 2 y 3 días (Figura 5.19 B).

Se puede observar que la concentración de prolina es mayor en la raíz que en el coleoptile en los tejidos control, sin embargo, el aumento en respuesta al déficit hídrico fue mayor en el segundo tejido que en el primero.

Cuando se analizaron los carbohidratos solubles, si bien se detectaron diferencias significativas al comparar por peso fresco de raíz y de coleoptile, no ocurrió lo mismo cuando la determinación se hizo por peso seco donde sólo se observaron diferencias significativas para raíz con 2 días postimbibición (Figura 5.20). En el análisis por peso fresco, se observaron aumentos del 74% y 82% en coleoptile de plantas tratadas para 2 y 3 días respectivamente; y del 115% y 84% en raíces para el mismo período (Figura 5.20 A). Cuando se analizó por gramo de peso seco, el incremento para raíz a los 2 días postimbibición fue del 57%.

En oposición a lo observado con la prolina, los carbohidratos solubles presentaron niveles superiores en coleoptile que en raíz, en todos los casos estudiados.

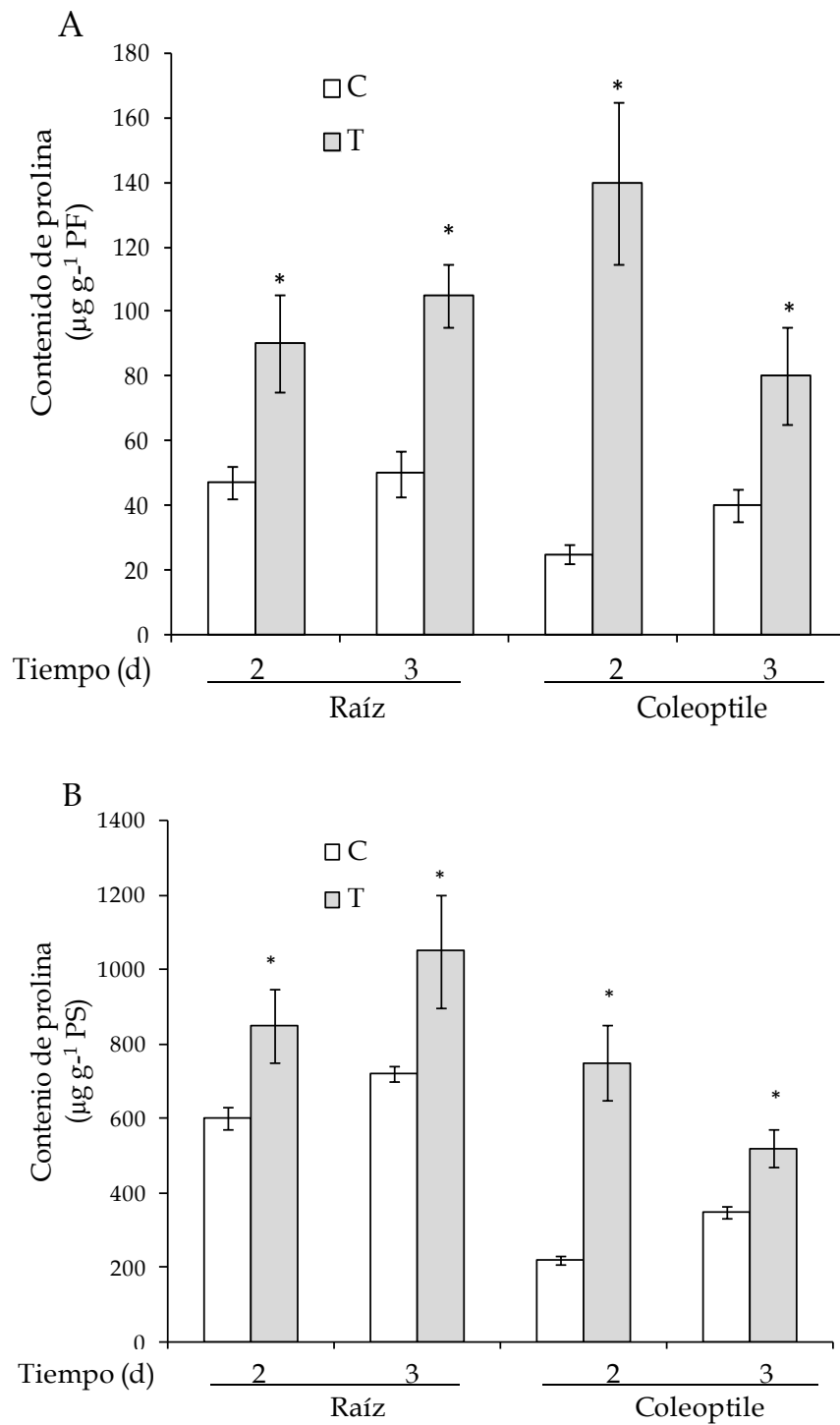


Figura 5.19. Efecto de la restricción hídrica sobre el contenido de prolina expresado en función de gramo (A) peso fresco y (B) peso seco. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de $-0,03$ MPa (3,4% p/v PEG) (C) o $-0,6$ MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control $*P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

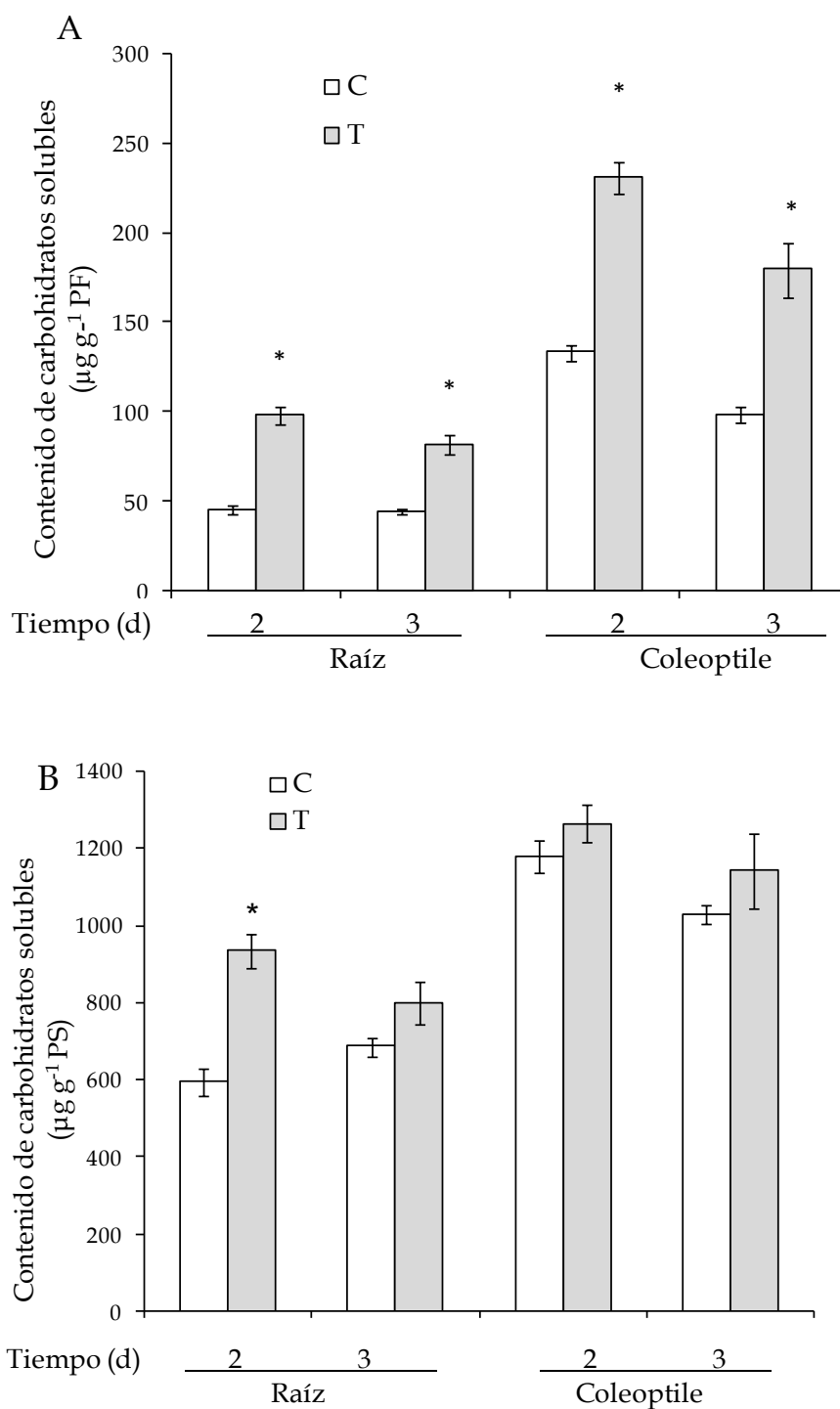


Figura 5.20. Efecto de la restricción hídrica sobre el contenido de hidratos de carbono expresado en función de gramo (A) peso fresco y (B) peso seco. Las plántulas germinaron y crecieron a Ψ_w de $-0,03$ MPa (3,4% p/v PEG) (C) o $-0,6$ MPa (22,2% p/v PEG) (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey.

6. Efecto del agregado de poliaminas

Para evaluar un posible efecto protector de las poliaminas durante la germinación y el crecimiento, Put y Spm se agregaron al medio de cultivo al inicio del proceso de imbibición, en concentraciones crecientes desde 0,001 a 1 mM. Luego de 3 días de imbibición, se determinó la longitud y el peso fresco en raíz y coleoptile tanto en plántulas sujetas a capacidad de campo como en plantas expuestas a estrés hídrico -0,6 MPa.

Ambas poliaminas tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento de la raíz cuando se incluyeron en el medio de cultivo en concentración de 1 mM, en condiciones de capacidad de campo, con una disminución de la longitud del 27% para Put y del 80% para Spm, y del 23 y 52%, respectivamente, en el peso fresco (Figura 5.21 A y C). Cuando se impuso el estrés hídrico, sólo 1 mM de Spm produjo una disminución del crecimiento (90% de la longitud y 84% del PF), que fue más pronunciada que la observada en condiciones control. La presencia de poliaminas en concentraciones menores a 1 mM no resultó en una reversión de la disminución de la longitud ni del PF ocasionado por la restricción hídrica (Figura 5.21 B y D).

Similar resultado se observó en coleptile aunque sólo en el tratamiento con 1 mM de Spm (Figura 5.22), no observándose diferencias significativas entre plantas control y bajo restricción hídrica con 1mM de Put y tampoco con ambas PA en niveles menores a 1 mM. Los coleoptiles de las plántulas no sometidas al déficit hídrico disminuyeron un 55% su longitud y un 40% su peso fresco cuando el medio de cultivo contenía 1mM de Spm, mientras que las plántulas sometidas a déficit hídrico sufrieron una disminución del 78% y 80%, respectivamente, en longitud y peso fresco.

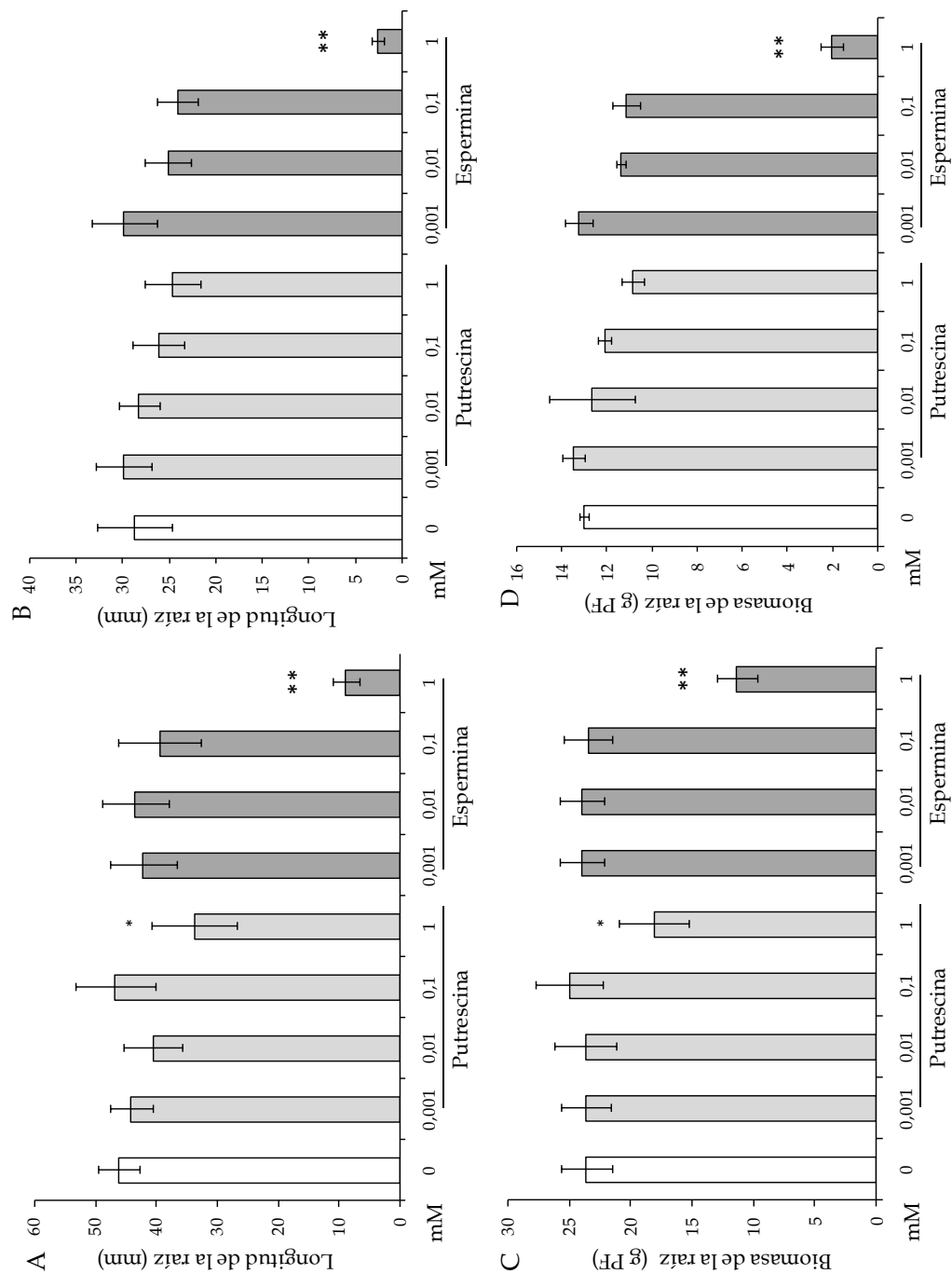


Figura 5.21. Efecto del agregado de poliaminas sobre la longitud y el peso fresco de la raíz. Las plántulas germinaron y crecieron a: A y C) Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) y B y D) -0,6 MPa (22,2% p/v PEG). A y B se corresponden a la longitud de la raíz, mientras que C y D al peso fresco. Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ y ** $p < 0,01$ de acuerdo al test de Tukey.

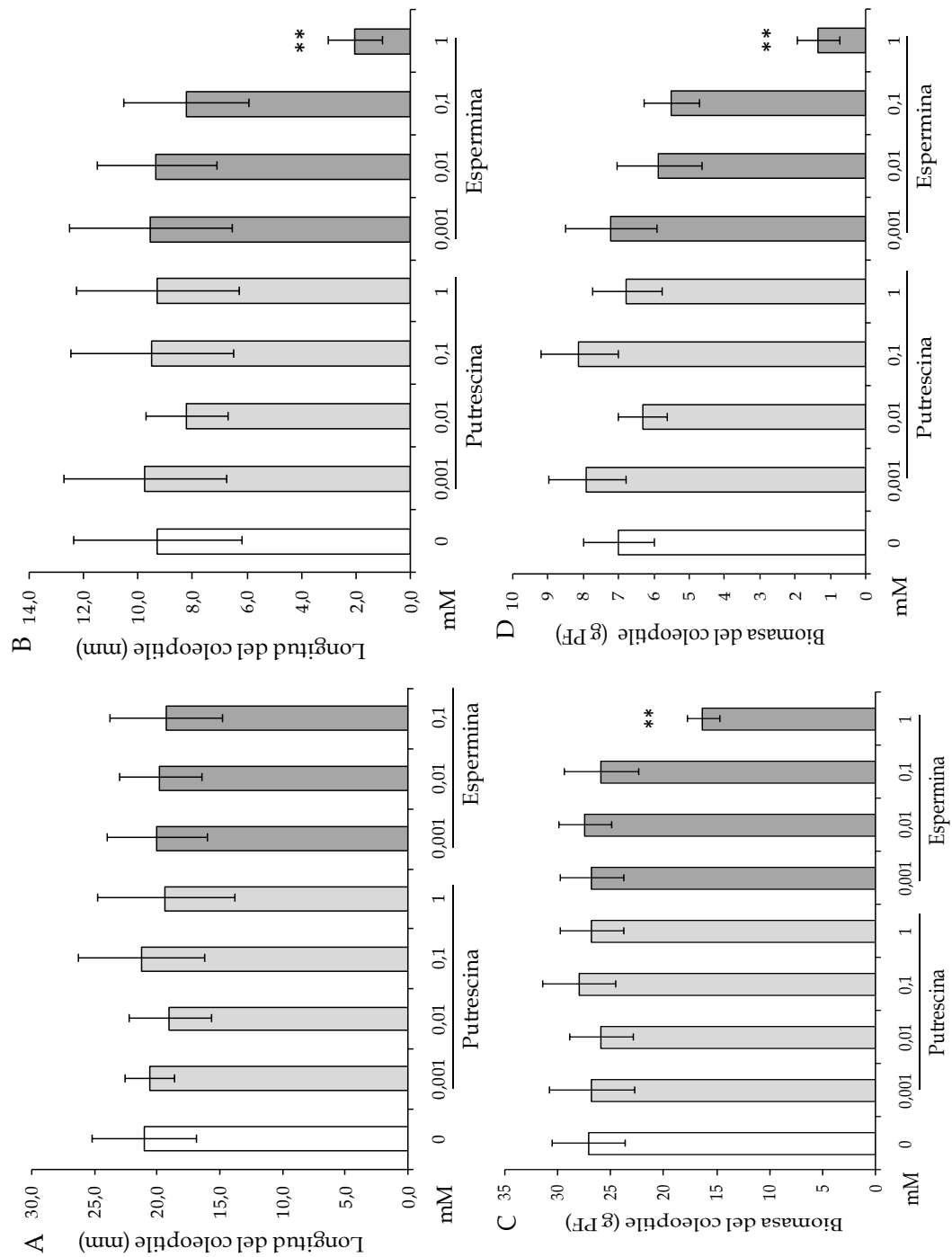


Figura 5.22. Efecto del agregado de poliaminas sobre la longitud y el peso fresco del coleoptile. Las plántulas germinaron y crecieron a: A y C) Ψ_w de -0,03 MPa (3,4% p/v PEG) y B y D) -0,6 MPa (22,2% p/v PEG). A y B se corresponden a la longitud del coleoptile, mientras que C y D con el peso fresco. Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control * $P < 0,05$ y ** $p < 0,01$ de acuerdo al test de Tukey.

Para evaluar un posible rol protector del NO durante la germinación y el crecimiento en condiciones de estrés hídrico, se agregó SNP como donador de NO en concentración 100 μmol al medio de incubación sobre semillas o plántulas en situación de capacidad de campo o sometidas a un estrés hídrico con un Ψ_w de -0,6 MPa. El SNP se agregó desde el inicio de la imbibición de las semillas y se cosechó el material vegetal a los 3 días de iniciado el ensayo. Se probaron dos situaciones. En un caso el SNP en la solución se mantuvo sólo el primer día mientras que en el otro el SNP estuvo durante los tres días (Figura 5.23).

El agregado de SNP durante 1 o 3 días no tuvo efecto sobre los parámetros medidos, longitud y peso fresco de la raíz, tanto en la condición de capacidad de campo como la de déficit hídrico (Figuras 5.23 A y B). En el caso del coleoptile, se determinó un leve incremento en el peso fresco, tanto de plántulas crecidas a capacidad de campo (11%) como en plántulas sometidas a estrés hídrico (8%), pero sólo resultó estadísticamente significativo cuando las plántulas se mantuvieron durante 3 días con SNP en condiciones de capacidad de campo (Figuras 5.23 C y D)

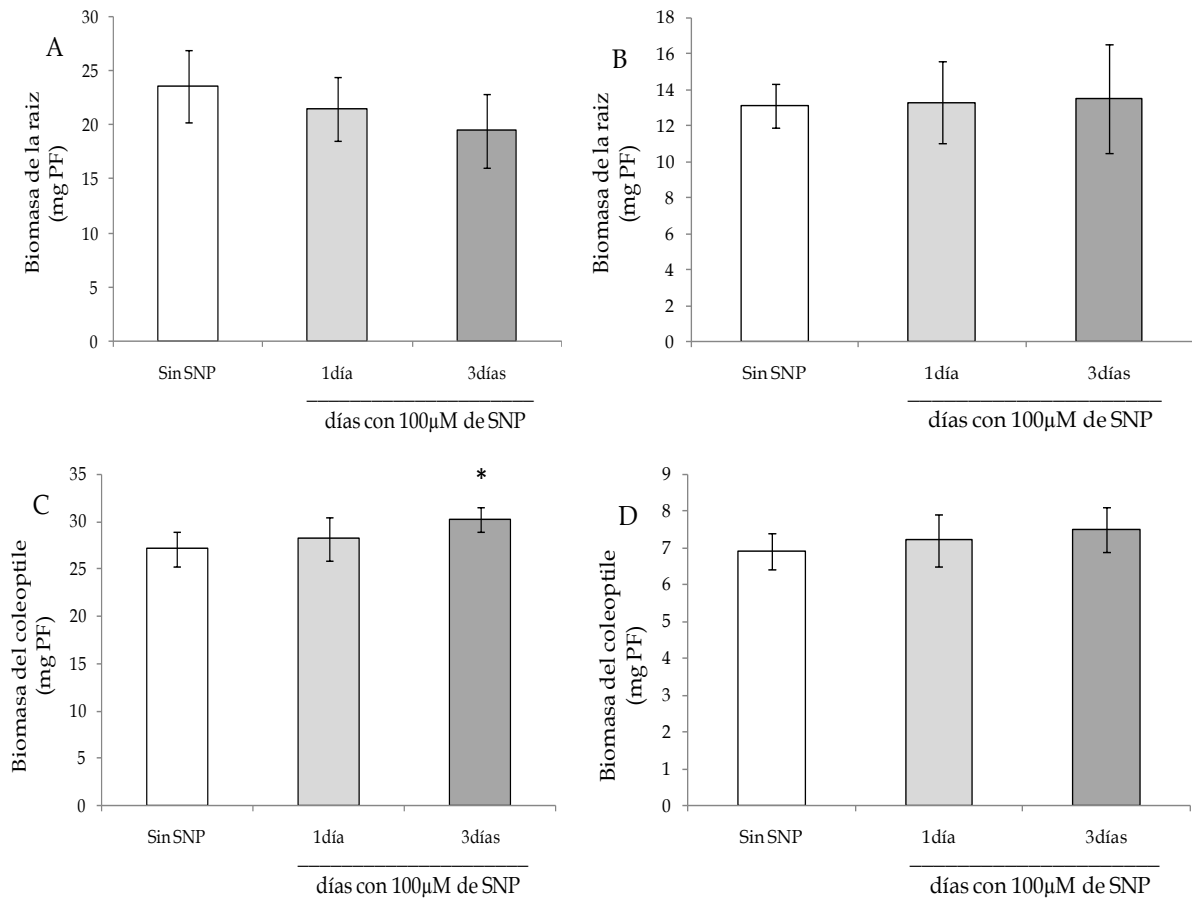


Figura 5.23. Peso fresco de raíces de plántulas en capacidad de campo (A) o sometidas a estrés hídrico (B), con agregado de 100 μmol de SNP al inicio de imbibición, durante uno o tres días y plántulas sin SNP, y (C) coleoptiles de plántulas sometidas a los mismos tratamientos en capacidad de campo y (D) bajo déficit hídrico. Sólo se observaron diferencias significativas * $p < 0,05$ respecto del control en coleoptile de plántulas en capacidad de campo con 3 días de SNP, y no se observaron diferencias significativas en plántulas sometidas a estrés hídrico, con o sin SNP, tanto para raíz como para coleoptile

7. Análisis de variedades de trigo especie *aestivum*

7.1. Longitud y biomasa del coleoptile y la raíz

Para verificar si el comportamiento observado en plántulas de trigo de la variedad Buck 75 aniversario también ocurría en otros cultivares de trigo especie *aestivum* cultivadas en la Región Pampeana de nuestro país, se evaluaron parámetros de crecimiento del coleoptile y la raíz luego de tres días post imbibición, en una concentración de PEG que semeja el potencial de capacidad de campo y bajo déficit hídrico moderado correspondiente a -0,6 MPa.

La restricción hídrica disminuyó significativamente el crecimiento de las plántulas de trigo medido como elongación de la raíz y del coleoptile, tanto como el peso fresco en ambos tejidos. Estos valores abarcan rangos entre 14% - 24% (representando cada valor a la variedad Buck 75 aniversario y MT 204) de disminución del largo de la raíz, y para el coleptile de 57% - 64% (para BioINTA2004 y BioINTA105, respectivamente). Para el peso fresco de la raíz la disminución abarcó de 38% a 50% (para Buck 75 aniversario y BioINTA105) y para el coleoptile 74% - 80% (para MT 204 - ProINTA Elite) de las plántulas tratadas respecto de las control (Figura 5.24). De los datos surge que el crecimiento del coleoptile fue más afectado por el déficit hídrico que la raíz en todas las variedades evaluadas.

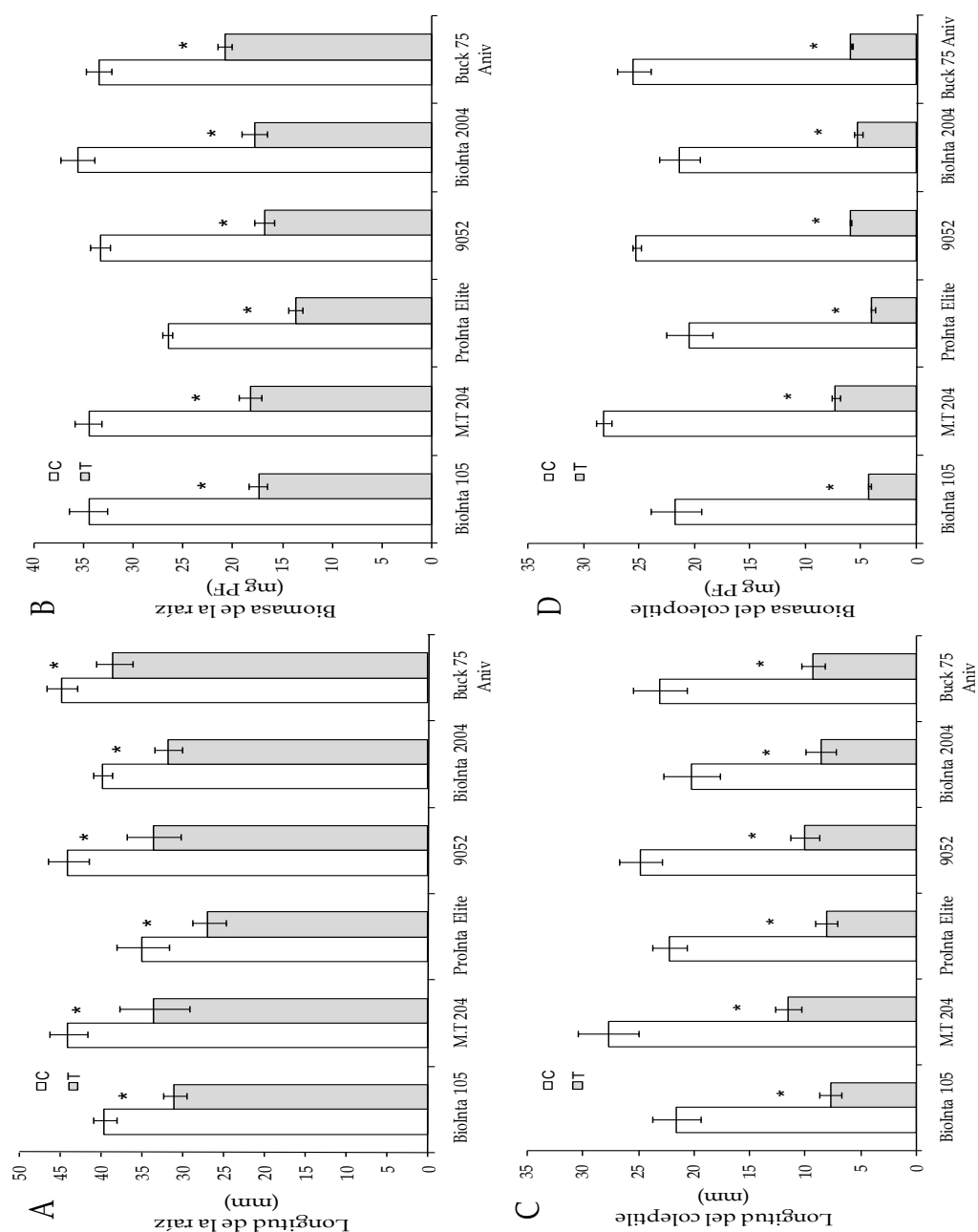


Figura 5.24. Efecto de la restricción hídrica sobre (A) y (B) la longitud y el peso fresco de la raíz y (C) y (D) la longitud y peso fresco del coleoptile, respectivamente, de variedades de trigo luego de la imbibición durante tres días en condiciones de capacidad de campo (C) y Ψ_w de $-0,6\text{MPa}$ (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control $*P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey ($n=40$) al comparar cada control con su tratado

En una aproximación para establecer una clasificación de las variedades respecto de su tolerancia a la restricción hídrica en el período analizado, se calculó el índice de tolerancia a partir de la fórmula $[\text{PF(T)}/\text{PF(C)}]*100$, o sea la relación entre el peso fresco de coleoptile o de la raíz determinado en la situación de

restricción hídrica respecto del peso fresco obtenido en las plántulas control (Figura 5.25 A y B). Este índice no sólo incluye la capacidad de producción de biomasa, sino la de acumular agua. Aquellas variedades cuyo índice sea menor indicarían mayor sensibilidad (o sea menor tolerancia) a la falta de agua.

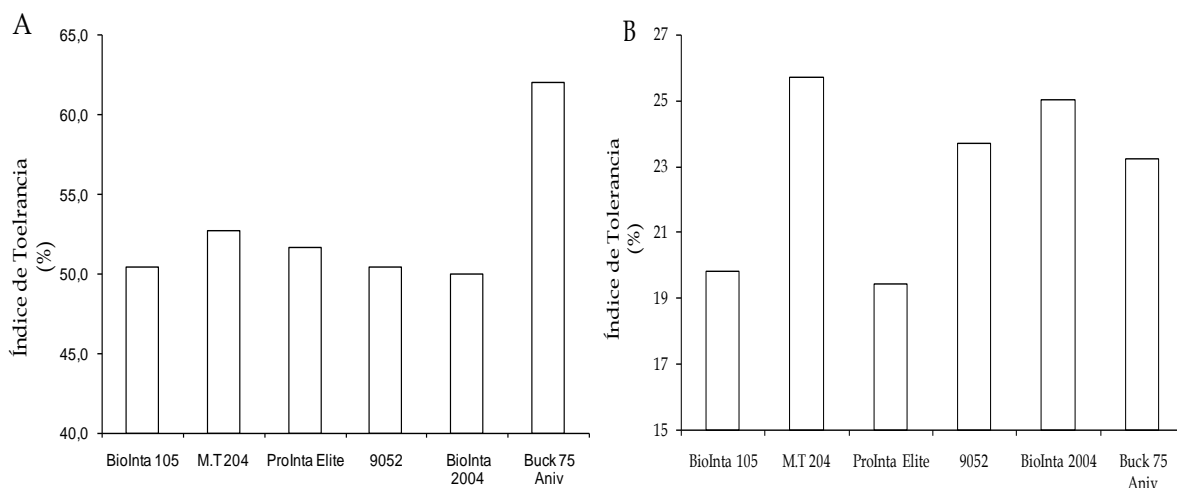


Figura 5.25. Índice de tolerancia a la restricción hídrica de diferentes variedades de trigo (A) raíz y (B) coleoptile, calculado como se detalla en el texto.

Está claro que este índice no es significativo en clasificar la tolerancia del trigo, solo es un estimado de las posibles diferencias entre las variedades comparadas. La variedad MT 204 fue la que demostró mayor tolerancia a la restricción hídrica cuando se analizó a nivel de coleoptile, seguida en orden decreciente por BioInta 2004, cv 9052, Buck 75 Aniversario, BioInta 105 y ProInta Elite. A nivel de raíz, la menor sensibilidad la mostró Buck 75 Aniversario, el resto de las variedades tuvieron un índice similar.

7.2. Actividad específica de catalasa

Cuando se compara la respuesta de la actividad específica de catalasa en la raíz se observó que tres variedades (BioInta 105, MT 204, 9052) respondieron de forma similar a Buck 75 Aniversario, incrementándose significativamente en las plántulas crecidas bajo restricción hídrica respecto de las raíces de los controles de

cada variedad. Mientras que en las otras dos variedades (ProInta Elite y BioInta 2004) no se observaron diferencias significativas (Figura 5.26 A).

En coleoptile, la restricción hídrica disminuyó la actividad específica en cuatro variedades, como lo observado en Buck 75 aniversario, respecto de las plántulas control. Mientras que la actividad específica en Pro Inta Elite no mostró modificaciones en las condiciones ensayadas (Figura 5.26 B).

Los valores observados oscilaron entre un incremento del 9%(ProINTA Elite) hasta 124%(MT 204) en raíz bajo déficit hídrico. Para coleoptile en cambio las plántulas bajo déficit hídrico disminuyeron su actividad específica entre un 0,04%(ProInta Elite) hasta un 46% (MT 204).

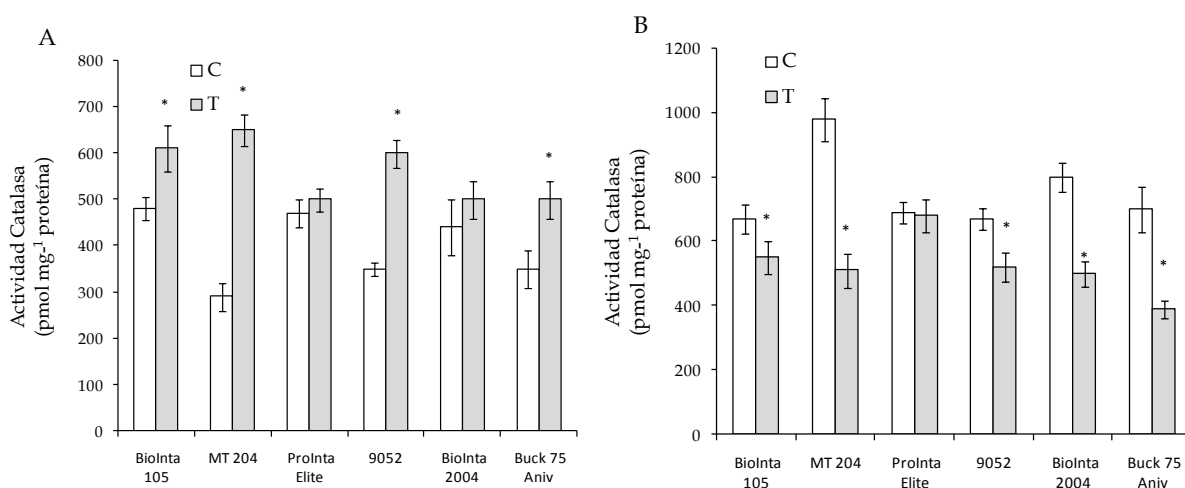


Figura 5.26 Actividad específica de catalasa en (A) raíz y (B) coleoptile de plántulas de variedades de trigo luego de la imbibición durante tres días en condiciones de capacidad de campo (C) y an Ψ_w de $-0,6\text{MPa}$ (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control $*P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey ($n=40$) al comparar cada control con su tratado

7.3. Contenido de prolina

En todas las variedades la prolina aumentó en respuesta a la restricción hídrica, tanto en el coleoptile (Figura 5.27) como en la raíz cuando se la expresó por peso fresco. Los incrementos observados en el contenido de prolina por peso fresco oscilaron entre 61% (9052) y 164%(BioINTA 105) para la raíz. Para el coleoptile los incrementos tuvieron un rango entre 40% (9052) y 462%(BioINTA 2004).

Por el contrario, cuando se la analizó en base al peso seco, los resultados no fueron exactamente iguales (Figura 5.28). Para el caso de la variedad “9052” se observó una disminución en el contenido de prolina (20%) en los coleoptiles de plántulas sometidas a déficit hídrico, aunque no resultó ser estadísticamente significativo. El máximo incremento en coleoptile se verificó en el cultivar BioINTA 2004 con 330%.

En las raíces, en todos los casos, se observó un incremento significativo de los niveles de prolina expresado por peso seco cuando se sometió a las plántulas a déficit hídrico que osciló entre 18% (MT 204) y 97% (ProINTA Elite)

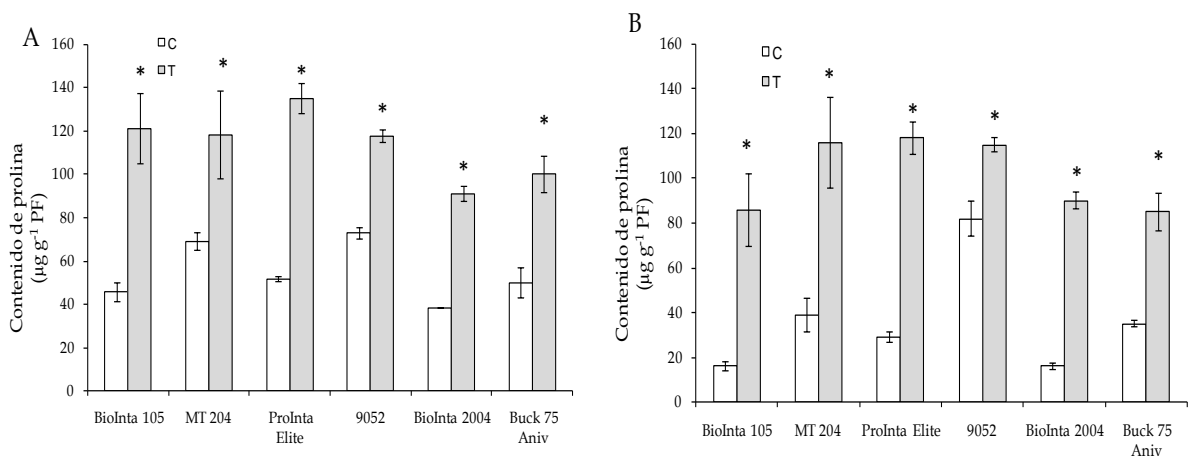


Figura 5.27. Contenido de prolina normalizado por el peso fresco (A) raíz y (B) coleoptile de plántulas de variedades de trigo luego de la imbibición durante tres días en condiciones de capacidad de campo (C) y Ψ_w de $-0,6\text{MPa}$ (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control $*P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey ($n=40$) al comparar cada control con su tratado

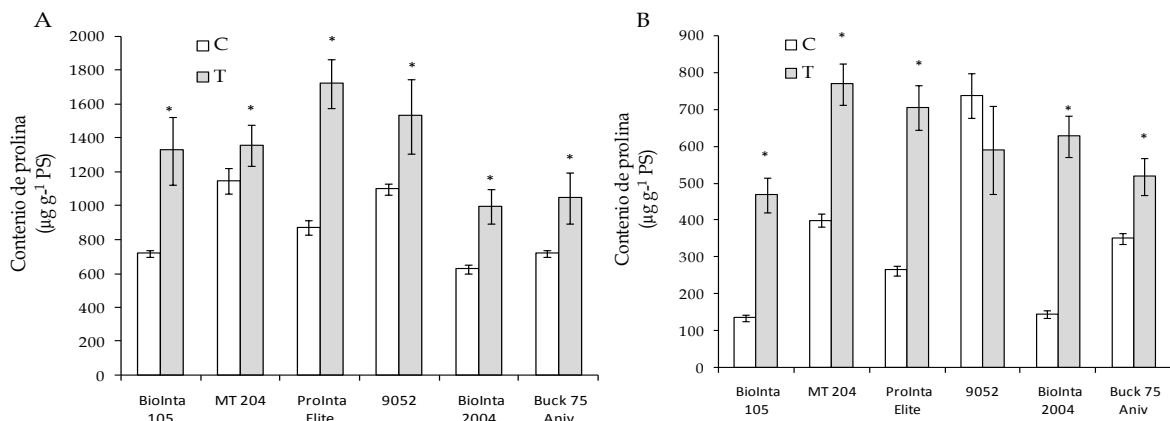


Figura 5.28 Contenido de prolina normalizado por el peso seco (A) raíz y (B) coleoptile de plántulas de variedades de trigo luego de la imbibición durante tres días en condiciones de capacidad de campo (C) y Ψ_w de $-0,6\text{MPa}$ (T). Los valores representan la media \pm SEM. Se muestran las diferencias significativas con respecto al valor control $*P < 0,05$ de acuerdo al test de Tukey ($n=40$) al comparar cada control con su tratado

Discusión

8. Restricción hídrica

8.1. El crecimiento

Para llevar a cabo de manera experimental los ensayos de restricción hídrica se utilizó el agregado de polietilenglicol de 6000 kDa (PEG6000) de masa promedio al medio de incubación líquido. El PEG es un poliéter hidrofílico, soluble en agua, ampliamente utilizado para estimular el estrés por sequía en plantas, ya que por un lado es capaz de reducir del Ψ_w de una solución acuosa y por otro no puede penetrar los poros de la pared por su gran tamaño y elevado peso molecular (Oertly 1985). Las ventajas de utilizar en el laboratorio este polímero son: 1) el estrés se lleva a cabo rápidamente, 2) es cuantificable y 3) es fácilmente reproducible para diferentes especies. Además, crea condiciones de crecimiento homogéneo necesarias para investigar patrones básicos de respuesta en las plantas en escalas de tiempo relativamente corto (Reynolds-Henne y col. 2010). Otros solutos de bajo peso molecular, como el manitol, pueden bajar el Ψ_w pero también puede penetrar los poros de la pared celular y causar plasmólisis, además de producir efectos tóxicos que pueden afectar los resultados ocasionados por el déficit hídrico (Verslues y col. 2006).

El desarrollo experimental planteado en este trabajo difiere considerablemente de los experimentos de campo, donde el agua se extrae de forma continua por las plantas y se pierde en la atmósfera por la transpiración (Cabuslay y col. 2002). Por lo tanto, en experimentos de campo donde se impone el estrés mediante el retiro del agua de riego durante algún tiempo se lleva a cabo una progresión de déficit de agua de leve a grave. En este trabajo, las plántulas fueron sometidas desde su germinación a una restricción hídrica constante.

Dentro de los signos comunes establecidos en plantas sometidas a déficit hídrico se encuentran inicialmente una reducción en la tasa de germinación y luego un menor crecimiento de la plántula (Soltani y col. 2006, Seki y col. 2007). Se ha estimado que para el caso del trigo es necesario incorporar una cantidad de humedad equivalente entre 35 y 45% del peso seco del grano para llevar a cabo la

germinación (Burck y Delouche 1959) entendiendo este proceso como una serie de eventos metabólicos y morfogénéticos que culminan con la emergencia de la radícula por fuera de las envolturas seminales, y que se producen cuando una semilla viable en estado de quiescencia se embebe con agua (Matilla 2003). En las condiciones ensayadas en este trabajo, hasta un potencial agua equivalente a -0,6 MPa en el medio de incubación no se modificó el índice de germinación del trigo, mientras que Ψ_w menores lo disminuyeron hasta un valor de potencial agua de -1,8 MPa, donde el proceso de germinación se inhibió totalmente. Sin embargo, aún con valores de Ψ_w donde la germinación ocurre en igual nivel que en capacidad de campo, el crecimiento de la plántula fue afectado de una manera directamente proporcional al potencial agua utilizado. Con estos datos y en un intento de avanzar en el conocimiento para comprender los mecanismos involucrados en esta limitación, se seleccionó -0,6 MPa como Ψ_w de trabajo, ya que en esta condición no se modifica el proceso de germinación pero si se observan efectos sobre el crecimiento, y los días 2 y 3 postimbibición como tiempos de estudio, ya que aseguran que la plántula se encuentra en una etapa de crecimiento quimioheterotrófico, independizando la respuesta obtenida del fenómeno fotosintético.

La restricción hídrica disminuyó la elongación del coleoptile en mayor proporción que la raíz. Si bien la emergencia del coleoptile en la superficie del suelo es vital en una planta para transformar su metabolismo de quimioheterótrofo a fotoautótrofo, en condiciones de bajo contenido de agua en el suelo es esencial para la sobrevivencia de la planta mantener el crecimiento de la raíz, ya que la elongación de la raíz le permite a la planta poder acceder a capas más profundas del perfil del suelo, donde el contenido de agua es usualmente mayor. El incremento en la relación raíz/vástago ha sido asociado a una reducción en el consumo de agua y a un aumento en la absorción (Erice y col. 2010), promoviendo de esta manera la resistencia de la planta a la sequía (Bajji y col. 2000).

Los datos obtenidos en las condiciones experimentales ensayadas reflejan que la disminución de la elongación no sería causada por una menor producción

de biomasa en la raíz de las plantas sometidas a déficit hídrico, sino que estaría dada fundamentalmente por una disminución en el contenido de agua. Por el contrario, en el coleoptile hubo una menor producción de biomasa, como lo demuestra los menores valores registrados al determinar el peso fresco y seco por individuo en las plantas crecidas en restricción hídrica. Estos resultados son coincidentes con la respuesta observada en arroz, donde el alargamiento de las hojas fue más afectado que la acumulación de la materia seca luego del estrés hídrico (Cabuslay y col. 2002). Por otro lado, Soltani y col. (2006) analizaron los efectos de la sequía sobre ambos componentes del crecimiento heterotrófico de las plántulas de trigo (peso de las reservas a movilizar de las semillas y eficiencia de la conversión en la utilización de las reservas de la semilla) y concluyeron que el componente sensible era el primero.

El estrés hídrico se tradujo en un aumento del contenido de proteínas solubles sobre la base del peso fresco de raíz y coleoptile en ambos tiempos estudiados. Sin embargo, teniendo en cuenta la magnitud de la pérdida de agua en cada caso este incremento reflejaría una concentración de proteínas debida a la pérdida de agua y no a un incremento real de las mismas.

8.2. La proliferación y la expansión celular

El ápice de las raíces de plantas crecidas bajo restricción de agua mostró similitud en el tamaño de la zona de proliferación y de transición con las plantas control, lo cual fue coincidente con el nivel similar de la expresión de genes responsables de la transición G1-S del ciclo celular. Si bien se ha reportado que el déficit hídrico puede afectar a casi todos los componentes del ciclo celular, los trabajos en su mayoría se refieren a la respuesta observada en hojas. Entre ellos se encuentran estudios que abarcan desde disminución en la expresión de ciclinas durante el estrés salino en hojas de *Arabidopsis* (Bursens y col. 2000), regulación negativa de los represores APC/C, incrementando la degradación proteolítica de ciclinas, durante un moderado estrés osmótico en hojas de *Arabidopsis* (Claeys y col. 2012), inducción de la proteína inhibitoria tipo-SIM por sequía en hojas de arroz (Peres y col. 2007). Cabe destacar que gran parte de estas respuestas de

control de la proliferación se han adjudicado a la función de las proteínas DELLAs, importantes reguladores negativos de la señalización por giberelinas (Claeys y col. 2014). Además, se ha reportado que en hojas de trigo (Schuppler y col. 1998) y *Arabidopsis* (Skirycz y col. 2011) el estrés osmótico y en maíz (Granier y col. 2000) el estrés hídrico, indujo acortamiento de los meristemas, prolongando la duración del ciclo celular como consecuencia de una reducida actividad de CDK. En raíz, la información sobre el efecto del déficit hídrico a nivel del ciclo celular es escasa y en muchos casos se relacionan con el estrés salino, donde a la restricción hídrica se le suma el efecto del catión Na^+ . Como ejemplo de este tipo de estudios, West y col. (2004) reportan modulación del ciclo celular en respuesta al estrés salino, que ocasionó un acortamiento del meristema en *Arabidopsis*. Los resultados encontrados en este trabajo y los reportados por la bibliografía indican que el efecto del déficit hídrico sobre la proliferación celular es diferente en raíz y en hoja, limitando el crecimiento aéreo y de esta forma disminuyendo la superficie de evaporación, y redirigiendo su crecimiento hacia la raíz para evadir o evitar la zona de bajo Ψ_w e incrementar las posibilidades de supervivencia.

En base a que la proliferación no se afectó durante el déficit hídrico en el modelo desarrollado, la expansión celular es el otro proceso a evaluar que conduce el crecimiento de la planta (Woolhouse, 1983). La fuerza que promueve la expansión celular es la presión de turgencia, generada dentro de la célula como resultado del ingreso de agua principalmente hacia la vacuola. Esta presión de turgencia es ejercida contra la resistencia que opone la pared celular. La expansión celular representa el delicado y controlado balance entre la resistencia y el aflojamiento de la pared celular. Dependiendo de la extensibilidad de la pared, la expansión celular se logra cuando la presión de turgencia supera la resistencia ejercida por la pared (Lockhart 1965, Cosgrove 1993). Como se ha descrito en el Capítulo 1, la extensibilidad de la pared celular es ejercida de un modo controlado a través de las expansinas (Cosgrove 2005). Los cinco genes de expansinas expresados en raíz se indujeron por el déficit hídrico cuando se los comparó con respecto a las plántulas control en la región apical y subapical. De esta forma, en trigo tanto como lo observado en *Glycine max* L. (soja) (Wu y col. 2005) y en maíz

(Wu y col. 2001), el aumento de los transcritos en la región apical se asociaría a un aumento de la elasticidad de la pared celular que contribuiría a mantener el crecimiento en condiciones de reducción de presión de turgencia (Claeys y Inzé, 2013). Se ha relacionado a la intervención del ácido abscísico (ABA) y el ácido 3-indol acético (AIA) (Zhao y col. 2012) como intermediarios en la inducción de la transcripción de los genes de expansinas en trigo. Las giberelinas también son conocidas por participar en la relajación de la pared celular a través de la inducción de la expresión de genes de expansinas y xiloglucan endotrasglucosilasa/endohidrolasa (XET), teniendo las proteínas DELLA a este nivel una actividad represiva de la expresión, en algunos casos por unión a los factores de transcripción (Claeys y col. 2014).

Como se discutió previamente en el caso de la respuesta a metales, si bien sólo se ha caracterizado una pequeña proporción de la superfamilia de las expansinas en el reino vegetal, las funciones individuales de muchos de los genes permanecen sin dilucidar. No obstante, en estos últimos años se ha correlacionado a las expansinas con variaciones en la dinámica del crecimiento durante el estrés abiótico (Sabirzhanova y col. 2005, Muller y col. 2007, Xu y col. 2007, Kwon y col. 2008, Harb y col. 2010 Guo y col. 2011, Li y col. 2011, Sasidharan y col. 2011, Zhao y col. 2012, Yan y col. 2014). En relación al estrés por déficit de agua, un aporte de Dai y col (2012) agrupa a las expansinas entre los genes de respuesta a la deshidratación (*dehydration-responsive genes*), registrando en flores de *Rosa hybrida* (rosa) el gen *RhEXT4*, cuya expresión en *Arabidopsis* confiere tolerancia a la sequía, y el silenciamiento de su expresión en los pétalos de rosas disminuyó la recuperación de los pétalos durante la rehidratación (Lü y col. 2013). Esto confirma los resultados encontrados en *Arabidopsis* y en girasol donde la detención de la expansión de la hoja en plantas sometidas a déficit hídrico es un proceso que puede ser revertido por el aumento de la disponibilidad de agua. Este atributo de las células permite que la expansión de la hoja aumente cuando la planta atraviesa ciclos de secado/rehidratación, donde las células vuelven a expandirse sugiriendo que sus paredes aún mantienen su estado de extensibilidad (Lechner y col. 2008).

Los resultados aportados por este trabajo, sumado a la bibliografía existente, muestran que la contribución de la proliferación y la expansión celular a la inhibición del crecimiento inducida por el déficit hídrico es también dependiente del tejido, de la especie y del estadio de desarrollo analizado.

8.3. El balance redox

Varias investigaciones en plantas de trigo han relacionado cambios en el sistema antioxidante con la prevención del daño oxidativo durante el déficit hídrico (Khanna-Chopra y Selote 2007, Jubany-Marí y col. 2010, Hameed y col. 2011). En un intento de saber si la restricción del crecimiento observada podía ser asociada al estrés oxidativo, se investigó el daño oxidativo a lípidos y proteínas. Tanto los niveles de TBARS como la carbonilación de proteínas en las raíces de las plántulas sometidas a estrés hídrico fueron comparables a las raíces control. Por lo tanto, es posible asumir que las células fueron capaces de mantener su balance redox y continuar creciendo a un potencial agua de -0,6 MPa. Respaldo esta idea, no se detectó incremento de las EAO en las raíces de las plántulas tratadas respecto del control.

Las actividades específicas de SOD y CAT aumentaron en la raíz debido a la restricción hídrica impuesta. En coincidencia con el incremento de la actividad de CAT, que fue la única peroxidasa que aumentó su nivel significativamente en las condiciones ensayadas, se detectó en el tejido radical una acumulación del transcritto *cat2*, pero no de *cat1*. Por el contrario, en el coleoptile el incremento de actividad se relaciona con una acumulación del producto de *cat1*. Un incremento en la actividad de CAT contribuiría a prevenir el daño oxidativo a través de la reducción de los niveles de H₂O₂, como ha sido ampliamente demostrado durante el estrés abiótico en plantas (Contento y Bassham 2010). Achard y col. (2008) postularon que la acumulación de proteínas DELLA durante el estrés osmótico aumentaría la expresión de genes correspondientes a enzimas antioxidantes como las Cu/Zn superóxido dismutasas (Cu/Zn-SOD) y catalasa, reduciendo así el nivel de EAO durante el estrés.

En cuanto a la actividad de CAT, los resultados obtenidos se condicen con lo reportado por Zhang y Kirkham (1994), quienes encontraron que la mayoría de las especies de *Triticum* expuestas a la sequía (de siete años estudiados) mostraron un aumento o mantenimiento de la actividad de CAT (y también SOD) en la fase temprana de la sequía.

La detección de una sola banda proteica de CAT en geles PAGE podría deberse a la presencia de isoformas muy similares en masa molecular y movilidad electroforética. Aunque García y col. (2000) purificaron dos isoformas de catalasa de trigo, ambas tenían similares propiedades y aparecían como una única banda en PAGE y eran inhibidas específicamente por el inhibidor 3-amino-1,2,4 triazole (3-AT). Por su parte, Song y col. (2007) sólo detectaron una isoenzima en raíces y hojas en plántulas de trigo tratadas con el herbicida fenilurea clorotoluron (inhibidor del transporte de electrones en la fotosíntesis). Una única isoforma de CAT también se observó durante la senescencia en trigo (Srivalli y Khanna-Chopra 2001), tanto como en hojas saludables en esta especie (Kwon y Anderson 2001).

Tanto para monocotiledóneas como dicotiledóneas se ha demostrado no sólo cambios temporales sino también espaciales en el patrón de expresión de genes de catalasa durante su desarrollo normal (Willekens 1994, Frugoli y col. 1996, Esaka y col. 1997, Srivalli y Khanna-Chopra 2001, Bagnoli y col. 2004, Santos y col. 2006, Zimmermann y col. 2006). Por otro lado también es conocido que tanto el estrés biótico como abiótico pueden modificar el perfil de expresión de esta familia de genes (Boldt y Scandalios 1997, Guan y Scandalios 2000, Mhamdi y col. 2010). Por ejemplo, en hojas de plantas de trigo de cinco semanas sometidas a 6 días de sequía moderada y severa, junto con cambios en los patrones de expresión de *cat1* y *cat2*, se detectó una disminución de la acumulación de ambos transcritos (Luna y col. 2005). En el análisis de promotores del gen de la catalasa de maíz se han identificado diferentes secuencias de ADN que responden a fitohormonas como ácido abscísico, jasmónico, salicílico y auxinas (Guan y Scandalios 2002, Mylona y col. 2007) y regiones regulatorias responsables de ritmo circadiano (Iwamoto y col. 2000, Kwon y Anderson 2001)

Si bien numerosas investigaciones reportan inducción de la actividad de APX en trigo por déficit hídrico (Chakraborty y Pradhan 2012, Secenji y col. 2010) y en genotipos tolerantes a la falta de agua (Sairam y col. 1998), en las condiciones ensayadas, la actividad de APX se redujo en las plantas crecidas en restricción hídrica. Una posible explicación a este resultado es la característica metabólica respecto a la obtención de energía y poder reductor de la plántula en el período analizado en este trabajo de Tesis. En estas condiciones no se ha establecido aún en la planta el metabolismo fototrófico, por lo tanto el poder reductor para sostener la totalidad del metabolismo proviene de las reservas acumuladas en la semilla. Es importante destacar que tanto para la síntesis del ácido ascórbico como para el reciclado de los intermediarios oxidados (monodehidroascorbato y dehidroascorbato) es necesaria gran cantidad de poder reductor. Además, las isoenzimas de APX son lábiles en ausencia de ácido ascórbico (Asada 1992). Esta restricción en la obtención de poder reductor podría ser entonces el principal factor responsable de la falta de respuesta a nivel de APX. De esta forma, se puede decir que durante el estadio de crecimiento analizado, se favoreció la actividad del par SOD-CAT para mantener bajos los niveles de H_2O_2 , en lugar de SOD-APX establecido en otros modelos.

Mantener el equilibrio redox celular es determinante, no solo en relación a su efecto sobre el ciclo celular (Sarsour y col. 2009), sino también para promover ajustes en la pared celular que involucran a las EAO (Gapper y Dolan 2006), sobre todo en condiciones de estrés hídrico (Noctor y col. 2014):

8.4. El ajuste osmótico

La acumulación de solutos compatibles se considera un indicador importante de la tolerancia fisiológica a diferentes estreses, como la sequía o la salinidad (Liu y col. 2011). En este sentido, se ha verificado en las raíces un aumento de la conductividad total, del contenido de prolina y carbohidratos solubles en respuesta a la restricción de agua, lo que representa un aumento de los osmolitos compatibles.

La acumulación de iones y compuestos de bajo peso molecular aumenta el potencial osmótico y de esta manera facilita el ingreso de agua a la célula (Parida y Das 2005, Ashraf y Foolad 2007). Además, los solutos compatibles orgánicos también poseen la habilidad de ejercer un efecto protector de tipo antioxidante contra el daño a las membranas (Ashraf y Foolad 2007, Contento y Bassham 2010). De esta forma contribuyen a la protección de las células contra los efectos del incremento en el nivel de las EAO y cooperan con el sistema de defensa antioxidante en el mantenimiento de la capacidad redox a bajo nivel de potencial agua (Bartels y Sunkar 2005, Miller y col. 2010, Sharma y col. 2011), permitiendo a la planta sustanciar su crecimiento aun bajo condiciones ambientales adversas.

En cuanto al rol de la prolina durante el estrés hídrico en trigo, Vendruscolo y col. (2007) propusieron que la tolerancia exhibida en plantas transgénicas que acumulaban altos niveles de prolina no sería sólo una consecuencia del ajuste osmótico generado sino de mecanismos protectores contra el daño oxidativo. En este sentido el incremento en el contenido de prolina se ha asociado con la inducción de la expresión de genes antioxidantes durante el estrés salino (Banu y col. 2009) y con una actividad de protección de membranas celulares, proteínas y del ADN (Matysik y col. 2002). La salida de electrolitos tanto de las raíces de las plantas de trigo control como de las sometidas a déficit hídrico fue similar, lo que sugiere que la integridad de la membrana plasmática no fue afectada por esta restricción hídrica. Este resultado está de acuerdo a lo reportado por Banu y col. (2009) en células de tabaco, donde la prolina protegió a las membranas de un aumento en su permeabilidad inducida por el cloruro de sodio. Además, dentro de las funciones de este metabolito, Sharma y col. (2011) proponen que la prolina sintetizada a nivel foliar y transportada a la raíz durante el estrés hídrico podría actuar como fuente de energía para el crecimiento radicular.

Los azúcares solubles también han sido implicados en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. Como la prolina, no solamente contribuyen a la regulación del ajuste osmótico sino que también están involucrados en el metabolismo y protección tanto de las vías de producción como las de destrucción de las EAO (Couée y col. 2006, Seki y col. 2007). Varios estudios han asociado la presencia de

ciertos azúcares solubles con la adquisición de tolerancia al estrés (Farrant 2007, Pinheiro y Chaves 2011). Zhang y col. (2012) demostraron que las plantas transgénicas de *Arabidopsis* TaMYB30-B acumulaban grandes cantidades de prolina libre y azúcares solubles respecto de las plantas no transformadas cuando eran sometidas a estrés hídrico, lo cual sugiere que la prolina y azúcares solubles son factores claves que contribuyen a la tolerancia al estrés hídrico de las plantas TaMYB3-B.

8.5. Efecto del agregado exógeno de poliaminas y nitroprusiato de sodio

Como se manifestó previamente, frecuentemente se han relacionado cambios en el sistema antioxidante durante el déficit hídrico con la prevención del daño oxidativo. Las poliaminas y el NO han sido postulados como moléculas con un potencial rol protector contra el daño oxidativo generado por diversos tipos de estrés abiótico (Groppa y Benavides 2008, Mata, Lamattina 2001). Se ha postulado que las PA actuarían detoxificando EAO, manteniendo la integridad de las membranas y estabilizando enzimas y proteínas (Groppa y Benavides 2008). En trabajos realizados en nuestro laboratorio hemos demostrado que la Spm fue capaz de proteger plantas de girasol y trigo sometidas a estrés por Cd o Cu, evitando el aumento de las EAO y revirtiendo parcialmente el daño oxidativo causado por los metales (Groppa y col. 2001, 2003), mientras que el NO, aplicado como SNP en forma previa a la aplicación del estrés, fue capaz de modificar la actividad de las enzimas antioxidantes y evitar la peroxidación lipídica y la clorosis en plantas de girasol tratadas con 500 μ M de Cl_2Cd (Laspina y col. 2005). Si bien no se observó daño oxidativo en las plántulas crecidas bajo déficit hídrico, hubo una variación de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y APX y una alteración del crecimiento causada por la restricción de agua, motivo por el cual se decidió estudiar el posible efecto protector contra el déficit hídrico ejercido por estos compuestos en plántulas de trigo. Si bien numerosos trabajos han reportado una alteración en los niveles endógenos de poliaminas y/o NO en plantas sometidas a sequía moderada o intensa (Zhou y Yu 2010, Fan y col. 2013), el objetivo en este trabajo de Tesis fue evaluar el rol de las poliaminas y el NO

agregados en forma exógena al medio de cultivo, estudiando particularmente su efecto sobre los parámetros de crecimiento. En este caso, el agregado exógeno de Spm y Put no resultó efectivo en la reversión de la disminución del crecimiento en las plantas de trigo bajo estrés hídrico comparadas con el control sin PA, observándose la misma respuesta en el caso del agregado de SNP como donador de NO. Fan y col. (2013) demostraron que el agregado exógeno de 100 μ M SNP como donador de NO, mejoró significativamente el crecimiento de plantas de pepino crecidas bajo estrés salino. Los autores postularon que el NO alivió el daño causado por el estrés salino regulando el contenido y las proporciones de las tres principales poliaminas, generando una disminución de Put y Spd y un aumento de Spm. Por su parte, Arasimowicz-Jelonek y col. (2009) observaron que la administración de NO previamente a la aplicación de estrés por sequía no afectaba los niveles endógenos de PA pero se correlacionaba positivamente con la reducción de la peroxidación lipídica y la permeabilidad de las membranas generado por el déficit hídrico

Asimismo, se ha sugerido que el ajuste osmótico y la alteración del contenido de poliaminas, especialmente Spd y Spm, juegan un rol importante en la adaptación de las plantas al estrés hídrico (Zhou y Yu 2010, Alcázar y col. 2006; Yamaguchi y col. 2007, Kubis 2008, Tang y Newton 2005) observaron que el agregado de poliaminas exógenas incrementaban la longitud de la raíces regeneradas de plántulas crecidas en medio de enraizamiento al incrementar las divisiones celulares en *Pinus virginiana*, cuando dicho medio se suplementaba con concentraciones de poliaminas de 0,001mmol, pero disminuía cuando se les aplicaba entre 0,01 y 1 mmol. Las poliaminas también provocaron un incremento en el desarrollo de raíces laterales lo que podría ser considerado una potencial respuesta adaptativa al déficit hídrico.

La existencia de una variedad de respuestas específicas relacionadas con la especie vegetal y aún con variedades de una misma especie sugiere una gran plasticidad genética en el control del crecimiento en respuesta a la limitación de agua, lo cual depende también del momento del desarrollo y la severidad del estrés (Baerenfaller y col. 2012). En este trabajo de Tesis, a pesar de no haber

podido evidenciar un rol protector de las poliaminas o del NO en el modelo experimental descripto, se propone continuar con el estudio de la participación de estas moléculas nitrogenadas en la respuesta de las plantas al estrés abiótico, dado el conocimiento que existe respecto a los diversos caminos en las que están involucradas durante la señalización de la respuesta al estrés.

8.6. Respuesta a la restricción hídrica de diferentes variedades trigo *aestivum*

El déficit de agua disminuyó el crecimiento de todas las variedades analizadas, donde Buck 75 Aniversario mostró un índice de tolerancia/sensibilidad intermedio cuando se analizó la respuesta del cotiledón y uno mayor respecto de la raíz. Cabe volver a aclarar que este índice es un estimado de la respuesta entre las variedades analizadas, pero que no tiene relevancia para clasificarlas a nivel de especie. En líneas generales, la variedad MT204 sería la primera de las 6 variedades estudiadas en emerger a la superficie para iniciar su metabolismo fotoautotrófico, mientras que Buck 75 Aniversario sería la que posee mayor capacidad para extender su exploración a un mayor volumen de suelo en búsqueda de humedad bajo condiciones de restricción hídrica.

Con respecto a la actividad de CAT, tal como fue observado por Zhang y Kirkham (1994) en 9 genotipos de trigo diploide, tetraploide y hexaploide sometidos a distintos niveles de estrés hídrico, la actividad de catalasa en la raíz se incrementó o se mantuvo durante los primeros días del estrés. Esto refuerza la importancia de esta enzima en el control de los niveles de H₂O₂ durante el estrés hídrico.

A nivel de prolina, si bien Hong-Bo y col. (2006) señalan una dependencia entre los niveles de este metabolito y la tolerancia a la sequía de diferentes cultivares de trigo, en el estadio de desarrollo y las variedades ensayadas en este trabajo de Tesis no se pudo establecer una correlación entre la concentración alcanzada de este osmolito y el crecimiento de la raíz o el coleoptile durante el déficit hídrico.

Capítulo 6

Conclusiones

Conclusiones

En este trabajo de Tesis se profundizó el estudio sobre aspectos relacionados con los mecanismos reguladores del crecimiento (proliferación y expansión celular) durante la fase post-germinativa de plantas de trigo sometidas a tratamientos con metales, cadmio y cobre, y a restricción hídrica, haciendo hincapié en sus efectos sobre la homeostasis redox y el ajuste osmótico celular.

Sobre la base de los resultados obtenidos se puede concluir que:

⇒ Aunque los factores de estrés abiótico suelen agruparse y compartir ciertos componentes fundamentales en los mecanismos de respuesta, las condiciones ambientales adversas afectaron a los procesos involucrados en el crecimiento radicular de manera diferencial,

-los metales afectaron el equilibrio redox, lo cual tuvo consecuencias directas sobre componentes del ciclo celular, bloqueando su progresión y restringiendo el proceso de proliferación celular

-durante el déficit hídrico se mantuvo el balance redox celular, el cual sería necesario para mantener los niveles de proliferación celular en el RAM. Bajo esta condición de restricción del potencial agua, el crecimiento se afectó a través de alteraciones en los mecanismos de expansión celular.

⇒ La carbonilación de proteínas consideradas claves para el ciclo celular (como la ciclina D y la CDKA) podría formar parte de un mecanismo mediador del arresto del crecimiento durante el estrés oxidativo, bloqueando el ciclo celular en el momento en que podrían ocurrir errores en la replicación o ruptura del ADN (transición G1/S), y de esta forma la célula podría reparar el daño previniendo la propagación de errores. La oxidación de proteínas no sería una consecuencia general del estrés, sino que surge la idea de modificaciones postraduccionales oxidativas intermediarias en el reconocimiento y la señalización durante el estrés.

⇒ El efecto observado sobre la oxidación/ubiquitinación de las proteínas del ciclo celular, sugiere la posibilidad de un mecanismo general de interacción de modificaciones postraduccionales (MPT) oxidativas con otras MPT, como la ubiquitinación, alterando en este caso la vía de degradación de las proteínas.

⇒ La zona de transición del RAM fue afectada por los tratamientos que alteraron la homeostasis redox celular, indicando la importancia del balance redox para que pueda llevarse adelante el ciclo celular.

⇒ El ajuste osmótico y el mantenimiento del equilibrio redox en la raíz pueden ser los puntos claves para superar el déficit hídrico moderado y continuar creciendo, aunque a baja velocidad, durante el crecimiento temprano del trigo.

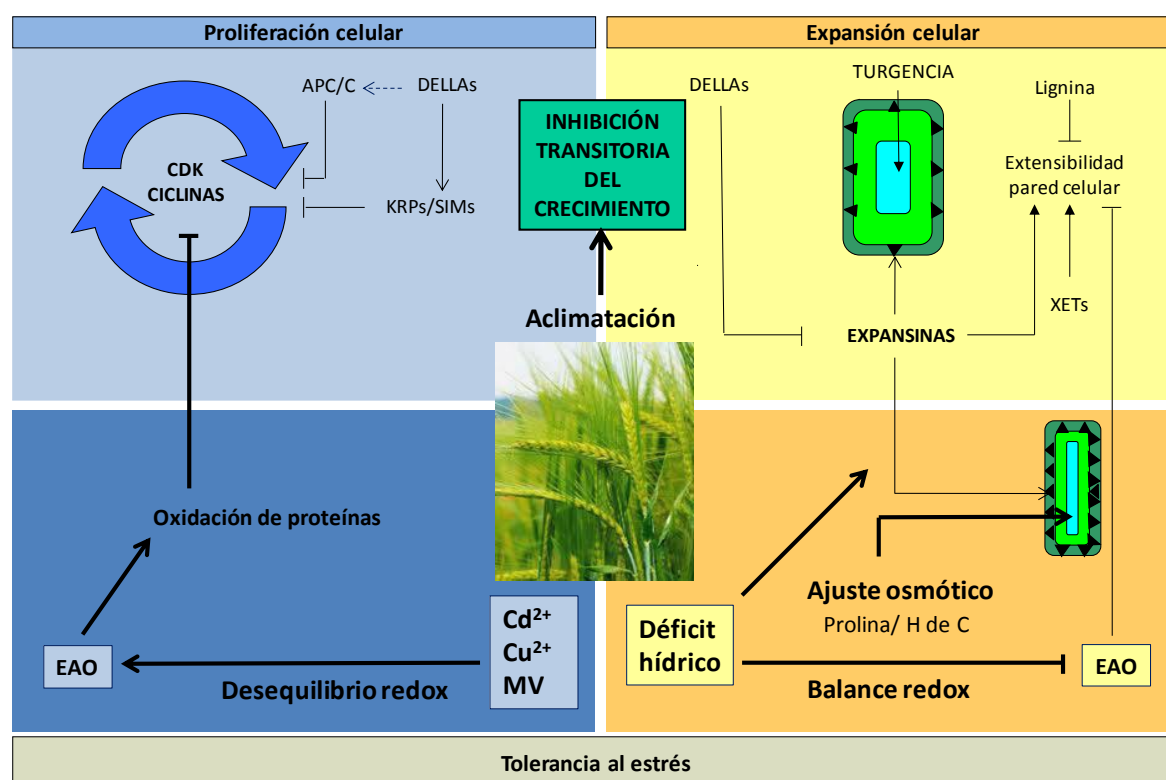
⇒ Las células de la raíz de las plántulas crecidas en restricción hídrica podrían ajustar su balance redox, al menos en parte, mediante la inducción y/o activación de la SOD y la CAT. Además de su conocido efecto osmótico, la acumulación de osmolitos compatibles podría estar implicada también en el ajuste redox celular. Si bien este equilibrio resultó en ausencia de daño oxidativo y alteración de la membrana celular, no fue suficiente para evitar una disminución en la elongación de la raíz. En condiciones de campo, este descenso supone un serio obstáculo para que las plántulas de trigo expandan sus raíces y accedan al agua en el suelo en una etapa fenológica en que el suministro de agua es crucial.

⇒ Debido a que se detectó un incremento en la expresión de genes de expansinas, se plantea la idea de que los cambios en la plasticidad de la pared celular serían de particular relevancia en este estadio del desarrollo del trigo, facilitando la expansión celular y permitiendo una pronta recuperación de la turgencia normal de las células existentes en caso de rehidratación.

⇒ Los efectos observados durante el déficit hídrico no se deben a un simple retraso en el tiempo de crecimiento (día 2 y 3 de desarrollo) sino a cambios metabólicos sufridos a nivel celular.

⇒ A pesar de encontrarse la plántula durante este estudio en crecimiento quimioheterótrofico, no es posible extrapolar la respuesta metabólica frente al déficit hídrico de un tejido al otro, como se demuestra con la diferente expresión de los genes *cat* en coleoptile y raíz.

Una fina red de regulación, mediada por la interacción entre las hormonas y el estado redox de las células, regularía el equilibrio espacio-temporal del número de células en división o expansión, así como la tasa de ambos procesos no sólo durante el crecimiento normal sino en respuesta a las condiciones adversas



Esquema modelo representativo de las conclusiones. Las líneas gruesas se corresponden a datos obtenidos en este trabajo que se suman a otros previamente obtenidos por diferentes autores tal como se describió en el Capítulo 1 y en las discusiones de los Capítulos 4 y 5. Xiloglucan endotransglucosilasas/endohidrolasa (XETs)

Perspectivas

Conocer el comportamiento de los procesos bioquímicos relacionados con el crecimiento durante estrés el abiótico en plantas es de fundamental interés para mejorar nuestra comprensión de los complejos mecanismos celulares que se desencadenan para hacer frente y sobrevivir a condiciones ambientales adversas. Esto permite por un lado aumentar el conocimiento que conlleva al desarrollo de nuevas estrategias moleculares que podrían ser eventualmente aplicadas en cultivos agronómicos, mejorando de esta forma su tolerancia a diferentes factores de estrés abiótico que afectarían su crecimiento y productividad.

De manera particular se ha sumado información donde se relaciona al dominio de transición del RAM como una zona oscilatoria donde, ya sea para entrar o salir de sus límites, las células están bajo un estricto control de factores endógenos o exógenos, conectando sin dudas el desarrollo de la raíz con el medio ambiente. Por otro lado, se destacan los fenómenos asociados a la pared celular como conductores/mediadores de la respuesta celular al estrés, probablemente no sólo relacionados con la inhibición del crecimiento, sino con la preparación para la recuperación.

Referencias

Referencias

- Acevedo A, Scandalios JG. 1991. Catalase and superoxide dismutase gene expression and distribution during stem development in maize. *Developmental Genetics* 12, 423-430.
- Achard P, Renou JP, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P. 2008. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology* 18, 656-660.
- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology* 51, 167-173.
- Alaoui-Sossé I, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint ML, Epron D, Badot PM. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science* 166, 1213-1218.
- Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T. 2006. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* 28, 1867-1876.
- Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Bitrián M, Tiburcio AF, Altabella T. 2010. Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 547-552.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species. Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 55, 373-399.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Kubiś J. 2009. Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in *Cucumber*. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 177-186.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85, 235-241.
- Ashraf M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206-216.
- ATSDR, 2005. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.
- Aust SD, Marehouse LA, Thomas CE. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* 1, 3-25.
- Azpilicueta CE, Benavides MP, Tomaro ML, Gallego SM. 2007. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in *Helianthus annuus* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 589-595.
- Azpilicueta CE, Pena LB, Tomaro ML, Gallego SM. 2008. Modifications in catalase activity and expression in developing sunflower seedlings under cadmium stress. *Redox Report* 13, 40-46.
- Bae H, Kim SH, Kim MS, Sicher RC, Lary D, Stream MD, Natarajan S, Bailey BA. 2008. The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 174-188.

- Baerenfaller K, Massonnet C, Walsh S, Baginsky S, Bühlmann P, Hennig L, Hirsch-Hoffmann M, Howell KA, Kahlau S, Radziejowski A, Russenberger D, Rutishauser D, Small I, Stekhoven D, Sulpice R, Svozil J, Wuyts N, Stitt M, Hilson P, Granier C, Gruissem W. 2012. Systems-based analysis of *Arabidopsis* leaf growth reveals adaptation to water deficit. *Molecular System Biology* 8, 606.
- Bagnoli F, Danti S, Magherini V, Cozza R, Innocenti AM, Racchi ML. 2004. Molecular cloning, characterization, and expression of two catalase genes from peach. *Functional Plant Biology* 31, 349-357.
- Bailly C, Leymarie J, Lehner A, Rousseau S, Côme D, Corbineau F. 2004. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of Experimental Botany* 55, 475-483.
- Bailly C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14, 93-107.
- Bajji MS, Lutts J, Kinet M. 2000. Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in callus culture issued from durum wheat (*Triticum durum*) cultivars differing in drought resistance. *Journal of Plant Physiology* 156, 75-83.
- Baker CJ, Mock NM. 1994. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39, 7-12.
- Banu NA, Hoque A, Watanabe-Sugimoto M, Matsuoka K, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y. 2009. Proline and glycine betaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 166, 146-156.
- Barceló J, Poschenrieder C. 1996. Aluminium phytotoxicity, a challenge for plant scientists. *Fertilizer Research* 43, 217-223.
- Barroco RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inzé D, Mironov V. 2003. Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 401-412.
- Bartels D, Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 23-58.
- Basta NT, Ryan JA, Chaney RL. 2005. Trace element chemistry in residual treated soil. *Journal of Environmental Quality* 34, 49-63.
- Bates LS, Waldren RP, Teare LD. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39, 205-207.
- Becana M, Aparicio Tejo P, Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M. 1986. Some enzyme of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiology* 82, 1169-1171.
- Beemster GTS, Fiorani F, Inze D. 2003. Cell cycle: the key to plant growth control?. *Trends in Plant Science* 8, 154-158.
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 131-136.

- Benavides MP, Marconi PL, Gallego SM, Comba ME, Tomaro ML. 2000. Relationship between antioxidant defence system and salt stress tolerance in *Solanum tuberosum* L. plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 273-278.
- Berckmans B, De Veylder L. 2009. Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 599-605.
- Berlett BS, Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20313-20316.
- Bhattacharjee S. 2012. The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany*. Article ID 985298.
- Boldt R, Scandalios JG. 1997. Influence of UV-light on the expression of the Cat2 and Cat3 catalase genes in maize. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 505-514.
- Boniotti MB, Gutierrez C. 2001. A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDK/cyclin D complex. *The Plant Journal* 28, 341-350.
- Bonomelli C, Bonilla C, Valenzuela A. 2003. Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38, 1179-1186.
- Boominathan R, Doran PM. 2003. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 158-167.
- Bosch EN, da Veiga A. 2002. Pérdida de fertilidad de un suelo agrícola. INTA. Buenos Aires.
- Boyer J. 1995. Measuring the water status of plants and soils. Academic Press
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Breuer C, Ishida T, Sugimoto K. 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 654-660.
- Brown LA, Baker A. 2008. Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix. *Molecular Membrane Biology* 25, 363-375.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM. 2011. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiologia Plantarum* 143, 297-308.
- Burck B, Delouche JC. 1959. Water absorption by seeds. *Proc. AOSA* 49, 142.
- Burssens S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inzé D, Verbruggen N. 2000. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211, 632-640.
- Cabuslay GS, Osamu I, Alejar AA. 2002. Physiological evaluation of responses of rice (*Oryza sativa* L.) to water deficit. *Plant Science* 163, 815-827.
- Calabrese EJ. 2005. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* 138, 378-411.

- Causin HF, Roqueiro G, Petrillo E, Láinez V, Pena LB, Marchetti CF, Gallego SM, Maldonado SI. 2012. The control of root growth by reactive oxygen species in *Salix nigra* Marsh. seedlings. *Plant Science* 183, 197-205.
- Chakraborty U, Pradhan B. 2012. Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H₂O₂ accumulation. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24, 117-130.
- Chan DY, Hale BA. 2004. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *Journal of Experimental Botany* 55, 2571-2579.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59, 527-605.
- Chandra Babu R, Safiullah Pathan M, Blum A, Nguyen HT. 1999. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Science* 39, 150-158.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30, 239-264.
- Chen Z, Chen YZ, Wang XF, Wang C, Yan RX, Zhang Z. 2011. Prediction of ubiquitination sites by using the composition of k-spaced amino acid pairs. *PLoS ONE* 6, 22930.
- Claeys H, De Bodt S, Inze D. 2014. Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends in Plant Science* 19, 231-239.
- Claeys H, Inzé D. 2013. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* 162, 1768-1779.
- Claeys H, Skirycz A, Maleux K, Inzé D. 2012. DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiology* 159, 739-747.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Contento AL, Bassham DC. 2010. Increase in catalase-3 activity as a response to use of alternative catabolic substrates during sucrose starvation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 232-238.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17, 1195-1214.
- Cosentino D. 2007. Principios de Edafología. Ed. Facultad de Agronomía.
- Cosgrove DJ. 1993. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake and hydraulic conductance. *International Journal of Plant Sciences* 154, 10-21.
- Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 850-861.
- Costa H, Gallego SM, Tomaro ML. 2002. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science* 162, 941-947.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57, 449-459.

- Criqui MC, Genschik P. 2002. Mitosis in plants: how far we have come at the molecular level?. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 487-493.
- Dai F, Zhang C, Jiang X, Kang M, Yin X, Lü P, Zhang X, Zheng Y, Gao J. 2012. RhNAC2 and RhEXPA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals. *Plant Physiology* 160, 2064-2082.
- Davies MJ. 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 1703, 93-109.
- De Tullio MC, Jiang K, Feldman LJ. 2010. Redox regulation of root apical meristem organization: Connecting root development to its environment. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 328-336.
- de Vries W, Römkens PFAM, Schütze G. 2007. Critical soil concentrations of cadmium, lead, and mercury in view of health effects on humans and animals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 191, 91-130.
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Barun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V, Murray JAH. 2007. *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are ratelimiting for cytokinin responses. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 104, 14537-14542.
- Doncheva S, Amenós M, Poschenrieder C, Barceló J. 2005. Root cell patterning: a primari target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56, 1213-1220.
- Doncheva S. 1998. Copper-induced alterations in structure and proliferation of maize root meristem cells. *Journal of Plant Physiology* 153, 482-487.
- Dyson RJ, Band LR, Jensen OE. 2012. A model of crosslink kinetics in the expanding plant cell wall: yield stress and enzyme action. *Journal of Theoretical Biology* 307, 125-136.
- Eising R, Trelease RN, Ni W. 1990. Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 278, 258-264.
- Ericea G, Louahlia S, Irigoyen JJ, Sanchez-Diaz M, Avise JC. 2010. Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology* 167, 114-120.
- Ernst WHO, Verkleij JAC, Schat H. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* 41, 229-248.
- Esaka M, Yamada N, Kitabayashi M, Setoguchi Y, Tsugeki R, Kondo M, Nishimura M. 1997. cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. *Plant Molecular Biology* 33, 141-155.
- Fan H, Du C, Guo S. 2013. Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. *Environmental and Experimental Botany* 86, 52-59.
- Farrant JM. 2007. Mechanisms of desiccation tolerance in Angiosperm resurrection plants. CAB International Press, Wallingford, UK.
- Foulkes EC. 1986. Cadmium. *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 80. Springer-Verlag.

- Foy CD, Chaney RL, White MC. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 29, 511-566.
- Foyer CH, Mullineaux PM. 1994. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28, 1056-1071.
- Francis D. 2007. The plant cell cycle—15 years on. *New Phytologist* 174, 261-278.
- Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, Mc Peek M, Thomas TL, McClung RC. 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 112, 327-336.
- Fufezan C, Rutherford AW, Krieger-Liszkay A. 2002. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters* 532, 407-410.
- Gajewska E, Skłodowska M. 2010. Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 996-1003.
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121, 151-159.
- Gallego SM, Kogan MJ, Azpilicueta CE, Peña C, Tomaro ML. 2005. Glutathione mediated antioxidative mechanisms in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cells in response to cadmium stress. *Plant Growth Regulation* 46, 267-276.
- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik MS, Groppa MD, Benavides MP. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83, 33- 46.
- Gapper C, Dolan L. 2006. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology* 141, 341-345.
- García JS, Gratão PL, Azevedo RA, Arruda MAZ. 2006. Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8623-8630.
- Garcia R, Kaid N, Vignaud C, Nicolas J. 2000. Purification and some properties of catalase from wheat germ (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1050-1057.
- Ghezzi P, Bonetto V. 2003. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3, 1145-1153.
- Gibbs JW. 1931. The collected works of J. Willard Gibbs. Vol 1. Longmans, Green and Co., New York.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- Gill SS, Tuteja N. 2011. Cadmium stress tolerance in crop plants. Probing the role of sulphur. *Plant Signaling and Behavior* 6, 1-8.
- Gough DR, Cotte TG. 2011. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death and Disease* 2, 1-8.

- Granier C, Inzé D, Tardieu F. 2000. Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34cdc2 kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiology* 124, 1393-1402.
- Greger M, Johansson M, Stihl A, Hamza K. 1993. Foliar uptake of Cd by pea (*Pisum sativum*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 88, 563-570.
- Groppa MD, Benavides MP. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35-45.
- Groppa MD, Benavides MP, Tomaro ML. 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Science* 164, 293-299.
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* 161, 481-488.
- Guan LM, Scandalios JG. 2000. Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 1182-1190.
- Guan LM, Scandalios JG. 2002. Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. *Physiologia Plantarum* 114, 288-295.
- Guan ZQ, Chai TY, Zhang YX, Xu J, Wei W. 2009. Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere* 76, 623-630.
- Guo W, Zhao J, Li X, Qin L, Yan X, Liao H. 2011. A soybean β -expansin gene GmEXPB2 intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. *The Plant Journal* 66, 541-552.
- Hall JL, Williams LE. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54, 2601-2613.
- Hameed A, Bibi N, Akhter J, Iqbal N. 2011. Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 178-185.
- Han YY, Li AX, Li F, Zhao MR, Wang W. 2012. Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, TaEXPB23, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 54, 49-58.
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A. 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154, 1254-1271.
- Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125, 189-198.
- Heijerick DG, Van Sprang PA, Van Hyfte AD. 2006. Ambient copper concentrations in agricultural and natural European soils: an overview. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 858-864.

- Hillel D. 1990. Laboratory Tests of a Theory of Fingering During Infiltration into Layered Soils. The British Journal for the Philosophy of Science.
- Hong J, Schöneich C. 2001. The metal-catalyzed oxidation of methionine in peptides by Fenton systems involves two consecutive one-electron oxidation processes. Free Radical Biology and Medicine 31, 1432-1441.
- Horne MC, Goolsby GL, Donaldson KL, Tran D, Neubauer M, Wahl AF. 1996. Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. Journal of Biological Chemistry 271, 6050-6061.
- Hu X, Cheng X, Jiang H, Zhu S, Cheng B, Xiang Y. 2010. Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*). Genetics and Molecular Research 9, 1490-1503.
- Iannone MF, Rosales EP, Groppa MD, Benavides MP. 2010. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium. Protoplasma 245, 15-27.
- Inzé D, De Veylder L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. Annual Review of Genetics 40, 77-105.
- Iqbal M, Bermond A, Lamy I. 2013. Impact of miscanthus cultivation on trace metal availability in contaminated agricultural soils: complementary insights from kinetic extraction and physical fractionation. Chemosphere 91, 287-294.
- Ivanov VB, Dubrovsky JG. 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. Trends in Plant Science 18, 237-243.
- Iwamoto M, Higo H, Higo K. 2000. Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5%-flanking region of CatA is not sufficient for circadian control. Plant Science 151, 39-46.
- Jackson RB, Sperry JS, Dawson TE. 2000. Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. Trends in Plant Science 5, 482-488.
- Jiang W, Liu D, Liu X. 2001. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. Biologia Plantarum 44, 105-109.
- Jubany-Marí T, Munné-Bosch S, Alegre L. 2010. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. Plant Physiology and Biochemistry 48, 351-358.
- Khanna-Chopra R, Selote DS. 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than - susceptible wheat cultivar under field conditions. Environmental and Experimental Botany 60, 276-283.
- Kish-Trier E, Hill CP. 2013. Structural biology of the proteasome. Annual Review of Biophysics 42, 29-49.
- Komaki S, Sugimoto K. 2012. Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. Plant and Cell Physiology 53, 953-964.
- Kponblekou A, Tabatabai M. 1994. Metal contents of phosphate rocks. Communications in Soil Science and Plant Analysis 26, 2781-1882.
- Kramer P, Boyer J. 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego.
- Kubis J. 2008. Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H₂O₂ and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves. Journal of Plant Physiology 165, 397-406.

- Kwon SI, Anderson AJ. 2001. Differential production of superoxide dismutase and catalase isozymes during infection of wheat by a *Fusarium proliferatum*-like fungal isolate. *Physiology Molecular Plant Pathology* 58, 73-81.
- Kwon YR, Lee HJ, Kim KH, Hong SW, Lee SJ, Lee H. 2008. Ectopic expression of Expansin3 or Expansin β 1 causes enhanced hormone and salt stress sensitivity in *Arabidopsis*. *Biotechnology Letters* 30, 1281-1288.
- La H, Li J, Ji Z, Cheng Y, Li X, Jiang S, Venkatesh PN, Ramachandran S. 2006. Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 275, 374-386.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against cadmium induced oxidative stress. *Plant Science* 167, 323-330.
- Lechner L, Pereyra-Irujo GA, Granier C, Aguirrezábal LAN. 2008. Rewatering plants after a long water-deficit treatment reveals that leaf epidermal cells retain their ability to expand after the leaf has apparently reached its final size. *Annals of Botany* 101, 1007-1015.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N. 2010. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 673-682.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn BW, Shaltfield S, Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 106, 464-478.
- Li CX, Feng SL, Shao Y, Jiang LN, Lu XY, Hou XL. 2007. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 19, 725-732.
- Li F, Han Y, Feng Y, Xing S, Zhao M, Chen Y, Wang W. 2013. Expression of wheat expansin driven by the RD29 promoter in tobacco confers water-stress tolerance without impacting growth and development. *Journal of Biotechnology* 163, 281-291.
- Li F, Xing S, Guo Q, Zhao M, Zhang J, Gao Q, Wang G, Wang W. 2011. Drought tolerance through over-expression of the expansin gene TaEXPB23 in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* 168, 960-966.
- Lin Z, Ni Z, Zhang N, Yao Y, Wu H, Sun Q. 2005. Isolation and characterization of 18 genes encoding α - and β -expansins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 274, 548-556.
- Liu CC, Liu YG, Guo K, Fan DY, Li GG, Zheng YR, Yu LF, Yang R. 2011. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany* 71, 174-183.
- Liu Y, Liu D, Zhang H, Gao H, Guo X, Wang D, Zhang X, Zhang A. 2007. The alpha- and beta-expansin and xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene families of wheat: molecular cloning, gene expression, and EST data mining. *Genomics* 90, 516-529.

- Lizana XC, Riegel R, Gomez LD, Herrera J, Isla A, McQueen-Mason SJ, Calderini DF. 2010. Expansins expression is associated with grain size dynamics in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 61, 1147-1157.
- Lockhart JA. 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8, 264-275.
- Loomis WD. 1969. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. *Methodos in Enzymology* 13, 555-563.
- López-Camelo LG, de Miguez SR, Marbán L. 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizer used in Argentina. *Science of the Total Environment* 204, 245-250.
- Lü P, Kang M, Jiang X, Dai F, Gao J, Zhang C. 2013. RhEXPA4, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis*. *Planta*. 237, 1547-1559.
- Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH. 2004. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany* 56, 417-423.
- Ma Z, Wu Y, Jin J, Yan J, Kuang S, Zhou M, Zhang Y, Guo A. 2013. Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66, 1002-1010.
- Madejón P, Ramírez-Benítez JF, Corrales I, Barceló J, Poschenrieder C. 2009. Copper-induced oxidative damage and enhanced antioxidant defenses in the root apex of maize cultivars differing in Cu tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67, 415-420.
- Madian AG, Regnier FE. 2010. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *Journal of Proteome Research* 9, 3766-3780.
- Maksymiec W. 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34, 321-342.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Mata CG, Lamattina L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* 126, 1196-1204.
- Matilla A. 2003. Ecofisiología de la germinación de semillas. En: Reigosa, M.J., N. Pedrol, A. Sánchez (eds.). *La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis*. Ediciones Paraninfo, Madrid.
- Matysik J, Alia A, Bhalu B, Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* 82, 525-532.
- McClung RC. 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 489-496.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G. 2010. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61, 4197-4220.
- Michel BE, Kaufmann MR. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51, 914-916.

- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33, 453-467.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science* 16, 300-309.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 459-481.
- Møller IM, Rogowska-Wrzesinsk A, Rao RSP. 2011. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics* 74, 2228-2242.
- Muller B, Bourdais G, Reidy B, Bencivenni C, Massonneau A, Condamine P, Rolland G, Conéjéro G, Rogowsky P, Tardieu F. 2007. Association of specific expansins with growth in maize leaves is maintained under environmental, genetic, and developmental sources of variation. *Plant Physiology* 143, 278-290.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of Experimental Botany* 59, 501-520.
- Mylona PV, Polidoros AN, Scandalios JG. 2007. Antioxidant gene responses to ROS-generating xenobiotics in developing and germinated scutella of maize. *Journal of Experimental Botany* 58, 1301-1312.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* 149, 88-95.
- Naouar N, Vandepoele K, Lammens T, Casneuf T, Zeller G, van Hummelen P, Weigel D, Rätsch G, Inzé D, Kuiper M, De Veylder L, Vuylsteke M. 2009. Quantitative RNA expression analysis with Affymetrix Tiling 1.0R arrays identifies new E2F target genes. *The Plant Journal* 57, 184-194.
- Navari-Izzo F, Cestone B, Cavallini A, Natali L, Giordani T, Quartacci MF. 2006. Copper excess triggers phospholipase D activity in wheat roots. *Phytochemistry* 67, 1232-1242.
- Neill S, Desikan R, Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 388-395.
- Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuyne K, Van Lijsebettens M, Kamiya Y, Inzé D, Beemster GTS. 2012. A local maximum in gibberellins levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Current Biology* 22, 1183-1187.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology Preview* DOI:10.1104/pp.113.233478
- Nriagu JO. 1996. A history of global metal pollution. *Science* 272, 223-224.

- Nyström T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal* 24, 1311-1317.
- Oertli JJ. 1985. The response of plant cells to different forms of moisture stress. *Journal of Plant Physiology* 121, 295-300.
- Orendi G, Zimmermann P, Baar C, Zentgraf U. 2001. Loss of stress-induced expression of catalase 3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. *Plant Science* 161, 301-314.
- Ortega-Villasante C, Hernández LE, Rellán-Álvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO. 2007. Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytology* 176, 96-107.
- Osakabe Y, Arinaga N, Umezawa T, Katsura S, Nagamachi K, Tanaka H, Ohiraki H, Yamada K, Seo SU, Abo M, Yoshimura E, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2013. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 609-624.
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 521-530.
- Palma M. 2007. Principios de Edafología. Ed. Facultad de Agronomía.
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, di Toppi LS, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L. 2008. Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant and Cell Physiology* 49, 362-374.
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 324-349.
- Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK. 2005. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 53, 299-314.
- Pena LB, Azpilicueta CE, Benavides MP, Gallego SM. 2012. Metal toxicity in plants: perception, signalling and remediation. Springer Heidelberg Dordrecht.
- Pena LB, Pasquini LA, Tomaro ML, Gallego SM. 2006. Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Science* 171, 531-537.
- Pena LB, Pasquini LA, Tomaro ML, Gallego SM. 2007. 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 1139-1146.
- Pena LB, Zawoznik MS, Tomaro ML, Gallego SM. 2008. Heavy metals effects on proteolytic system in sunflower leaves. *Chemosphere* 72, 741-746.
- Peres A, Churchman ML, Hariharan S, Himanen K, Verkest A, Vandepoele K, Magyar Z, Hatzfeld Y, Van Der Schueren E, Beemster GTS, Frankard V, Larkin JC, Inzé D, De Veylder L. 2007. Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *Journal of Biological Chemistry* 282, 25588-25596.
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32, 539-548.

- Pető A, Lehotai N, Lozano-Juste J, León J, Tari I, Erdei L, Kolbert Z. 2011. Involvement of nitric oxide and auxin in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings. *Annals of Botany* 108, 449-457.
- Pinheiro C, Chaves MM. 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of Experimental Botany* 62, 869-882.
- Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitaó MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 39, 1008-1018.
- Piñeros MA, Shaff JE, Kochian V. 1998. Development, characterization, and application of a cadmium-selective microelectrode for the measurement of cadmium fluxes in roots of *Thlaspi* species and wheat. *Plant Physiology* 116, 1393-1401.
- Potters G, Horemans N, Jansen MAK. 2010. The cellular redox state in plant stress biology. A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 292-300.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen MAK. 2009. Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell and Environment* 32, 158-169.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme, KJ, Jansen MAK. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends in Plant Science* 12, 98-105.
- Pritsa TS, Fotiadis EA, Lolas PC. 2008. Corn tolerance to atrazine and cadmium and sunflower to cadmium in soil and hydroponic culture. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39, 1168-1182.
- Puig S, Penarrubia L. 2009. Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 299-306.
- Puig S, Thiele DJ. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 171-180.
- Ramírez-Parra E, Fründt C, Gutierrez C. 2003. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 33, 801-811.
- Raskin I, Kumar NPBA, Dushenkov S, Salt DE. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5, 285-290.
- Ratto S. 2007. Principios de Edafología. Ed. Facultad de Agronomía, 2007
- Reynolds-Henne CE, Langenegger A, Mani J, Schenk N, Zumsteg A, Feller U. 2010. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany* 68, 37-43.
- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. 2008. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 59, 3781-3801.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M, Zabalza A, Corpas F, Gómez M, Del Río L, Sandalio L. 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment* 29, 1532-1544.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano TM, Risueño MC, del Río LA, Sandalio LM. 2009. Cellular response of pea plants to cadmium

- toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* 150, 229-243.
- Roeder AHK. 2012. When and where plant cells divide: a perspective from computational modeling. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 638-644.
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 677-686.
- Rouhier N, Koh CS, Gelhaye E, Corbier C, Favier F, Didierjean C, Jacquot JP. 2008. Redox based anti-oxidant systems in plants: biochemical and structural analyses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 1249-1260.
- Saadalla MM, Quick JS, Shanahan JF. 1990. Heat tolerance in winter wheat. Membrane thermostability and field performance. *Crop Science* 30, 1248-1251.
- Sabirzhanova IB, Sabirzhanov BE, Chemeris AV, Veselov DS, Kudoyarova GR. 2005. Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 419-422.
- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC. 1998. Role of antioxidant aystems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum* 41, 387-394.
- Sampedro J, Cosgrove DJ. 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* 6, 1-10.
- Santner A, Estelle M. 2010. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The Plant Journal* 61, 1029-1040.
- Santos I, Pires H, Almeida JM, Fidalgo F, Confraria A, Duarte M, Borlido J, Salema R. 2006. Phylogenetic relationship of potato CAT1 and CAT2 genes, their differential expression in non-photosynthetic organs and during leaf development, and their association with different cellular processes. *Functional Plant Biology* 33, 639-651.
- Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC. 2009. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants and Redox Signalling* 11, 2985-3011.
- Sasayama D, Azuma T, Itoh K. 2011. Involvement of cell wall-bound phenolic acids in decrease in cell wall susceptibility to expansins during the cessation of rapid growth in internodes of floating rice. *Journal of Plant Physiology* 168, 121-127.
- Sasidharan R, Voeselek LA, Pierik R. 2011. Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30, 548-562.
- Scandalios J. 1987. The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: Regulation, functional significance and molecular biology. New York: Alan R Liss.
- Scandalios JG, Acevedo A, Rusza S. 2000. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. *Plant Science* 156, 103-110.
- Scandalios JG. 1997. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA.
- Schulze ED, Beck E, Müller-Hohenstein K. 2005. Autecology: whole plant ecology. In plant ecology. Springer, Berlin

- Schuppler U, He P-H, John PCL, Munns R. 1998. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* 117, 667-678.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in *Scots pine* roots. *Plant Physiology* 127, 887-898.
- Secenji M, Hideg E, Bebes A and Gyorgyey J. 2010. Transcriptional differences in gene families of the ascorbate-glutathione cycle in wheat during mild water deficit. *Plant Cell Reports* 29, 37-50.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 296-302.
- Severina I. 2006. Informe análisis de muestra de suelo manisero, Gral Cabrera, Proyecto Agricultura sustentable.
- Sgherri C, Quartacci MF, Navari-Izzo F. 2007. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *Journal of Plant Physiology* 164, 1152-1160.
- Shao Hong-Bo S, Xiao-Yan C, Li-Ye C, Xi-Ning Z, Zan-Min H. 2006. Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 53, 113-119.
- Sharma S, Villamor JG, Verslues PE. 2011. Essential role of tissue specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology* 157, 292-304.
- Shaw AJ. 1990. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press. USA.
- Skirycz A, Claeys H, De Bodt S, Oikawa A, Shinoda S, Andriankaja M, Maleux K, Eloy NB, Coppens F, Yoo S-D, Saito K, Inzé D. 2011. Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *Plant Cell* 23, 1876-1888.
- Slatyer R, Taylor S. 1960. Terminology in plant and soil water relations. *Nature* 187, 922-924.
- Sobkowiak R, Deckert J. 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 767-772.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Levine A. 1999. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11, 431-444.
- Soltani A, Gholipoor M, Zeinali E. 2006. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany* 55, 195-200.
- Song NH, Yin XL, Chen GF, Yang H. 2007. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. *Chemosphere* 68, 1779-1787.
- Souza VL, de Almeida AA, Lima SG, de M Cascardo JC, da C Silva D, Mangabeira PA, Gomes FP. 2011. Morphophysiological responses and programmed cell

- death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Biomaterials* 24, 59-71.
- Srivalli B, Khanna-Chopra R. 2001. Induction of new isoforms of superoxide dismutase and catalase enzymes in the flag leaf of wheat during monocarpic senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288, 1037-1042.
- Stals H, Inzé D. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science* 6, 359-364.
- Sun LT, Zhang Y, Chai T. 2011. Cloning characterization, and expression of the BjEXPA1 gene and its promoter region from *Brassica juncea*. *Plant Growth Regulation* 64, 39-51.
- Taiz L, Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*. 5ta Edición. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- Takahashi N, Lammens T, Boudolf V, Maes S, Yoshizumi T, De Jaeger G, Witters E, Inze D, De Veylder L. 2008. The DNA replication checkpoint aids survival of plants deficient in the novel replisome factor ETG1. *EMBO Journal* 27, 1840-1851.
- Tamás L, Mistrík I, Huttová J, Halušková L, Valentovičová K, Zelinová V. 2010. Role of reactive oxygen species-generating enzymes and hydrogen peroxide during cadmium, mercury and osmotic stresses in barley root tip. *Planta* 231, 221-231.
- Tang W, Ronald J. Newton RJ. 2005. Polyamines promote root elongation and growth by increasing root cell division in regenerated Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) plantlets. *Plant cell reports* 24, 581-589.
- Tank JG, Thaker VS. 2011. Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. *Biologia Plantarum* 55, 201-212.
- Thounaojam TC, Panda P, Mazumdar P, Kumar D, Sharma G.D, Sahoo L, Panda S.K. 2012. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 53, 33-39.
- Turner NC. 1986. Crop water deficit: a decade of progress. *Advances in agronomy* 39, 1-51.
- Ueno D, Yamaji N, Kono I, Huang CF, Ando T, Yano M, Ma JF. 2010. Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107, 16500-16505.
- UNEP, 2008-2010. Programa Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Fuente <http://www.unep.org/spanish/>
- Uribe EG, Stark B. 1982. Inhibition of photosynthetic energy conversion by cupric ion. Evidence for Cu²⁺-coupling factor 1 interaction. *Plant Physiology* 69, 1040-1045.
- Van Assche F, Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13, 195-206.
- Vandepoele K, Vlieghe K, Florquin K, Hennig L, Beemster GTS, Grissem W, Van de Peer Y, Inzé D, De Veylder L. 2005. Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiology* 139, 316-328.

- Vendruscolo EC, Schuster I, Pileggi M, Scapim CA, Molinari HB, Marur CJ, Vieira LG. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology* 164, 1367-1376.
- Verslues P, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45, 523-539.
- Verslues PE, Zhu JK. 2005. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions* 33, 375-379.
- Vierstra RD. 2012. The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiology* 160, 2-14.
- Vranová E, Inés D, Van Breusegem F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53, 1227-1236.
- Wang F, Huo SN, Guo J, Zhang WS. 2006. Wheat D-type cyclin Triae;CYCD2;1 regulate development of transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 224, 1129-1140.
- Wang GF, Kong HZ, Sun YJ, Zhang XH, Zhang W, Altman N, DePamphilis CW, Ma H. 2004. Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology* 135, 1084-1099.
- Wang XD, Lapi E, Sullivan A, Ratnayaka I, Goldin R, Hay R, Lu X. 2011. SUMO-modified nuclear cyclin D1 bypasses Ras-induced senescence. *Cell Death and Differentiation* 18, 304-314.
- Wen JF, Gong M, Liu Y, Hu JL, Deng M. 2013. Effect of hydrogen peroxide on growth and activity of some enzymes involved in proline metabolism of sweet corn seedlings under copper stress. *Scientia Horticulturae* 164, 366-371.
- West G, Inzé D, Beemster GTS. 2004. Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiology* 135, 1050-1058.
- Willekens H, Langebartels C, Tiré C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W. 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 10450-10454.
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* 44, 301-305.
- Woolhouse HW. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*. SpringerVerlag, Berlin and New York.
- Wu Y, Jeong B-R, Fry SC, Boyer JS. 2005. Change in XET activities, cell wall extensibility and hypocotyl elongation of soybean seedlings at low water potential. *Planta* 220, 593-601.
- Wu Y, Thorne ET, Sharp RE, Cosgrove DJ. 2001. Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiology* 126, 1471-1479.
- Xing S, Li F, Guo QF, Liu DR, Zhao XX, Wang W. 2009. The involvement of an expansin gene TaEXPB23 from wheat in regulating plant cell growth. *Biologia Plantarum* 53, 429-434.

- Xu J, Tian J, Belanger FC, Huang B. 2007. Identification and characterization of an expansin gene AsEXP1 associated with heat tolerance in C3 *Agrostis* grass species. *Journal of Experimental Botany* 58, 3789–3796.
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael AJ, Kusano T. 2007. A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 12, 486-490.
- Yan A, Wu M, Yan L, Hu R, Ali I, An Yan, Gan Y. 2014. AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 9, 85208.
- Yemm EW, Willis AJ. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal* 57, 508-514.
- Yruela I. 2005. Copper in plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 145-156.
- Zhang J, Kirkham MB. 1994. Drought stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology* 35, 785-791.
- Zhang L, Zhao G, Xia C, Jia J, Liu X, Kong X. 2012. A wheat R2R3-MYB gene, TaMYB30-B, improves drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 63, 5873-5885.
- Zhao MR, Han YY, Feng YN, Li F, Wang W. 2012. Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Reports* 31, 671-685.
- Zhou Q, Yu B. 2010. Changes in content of free, conjugated and bound polyamines and osmotic adjustment in adaptation of vetiver grass to water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 417-425
- Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U. 2006. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell and Environment* 29, 1049-1060.

Resumen

Resumen

Uno de los principales efectos del estrés abiótico en plantas es la inhibición del crecimiento, afectando en muchos casos la productividad y/o supervivencia de los cultivos. El **objetivo** del presente trabajo fue contribuir a la comprensión acerca de cuáles son los mecanismos involucrados en la modificación de la proliferación y la expansión celular, en términos de cambios metabólicos y ajustes bioquímicos que realizan las plantas de trigo sujetas a condiciones ambientales desfavorables. Se utilizó a la variedad Buck 75 Aniversario, estableciéndose la etapa postgerminativa como tiempo de estudio, donde la planta se encuentra en metabolismo quimoheterotrófico. Las semillas se colocaron en soluciones que contenían metales (cadmio, un metal redox inactivo, cobre, un metal redox activo), metilviológeno (MV, herbicida caracterizado como generador de anión superóxido), peróxido de hidrógeno (una especie activa del oxígeno) y polietilenglicol (agente reductor del potencial agua, Ψ_w) en diferentes concentraciones. Los ensayos abarcaron como tiempo máximo el cuarto día postinbibición.

Los tratamientos con metales, MV y H_2O_2 disminuyeron la elongación de la raíz apresurando el desplazamiento de las células encontradas en la zona de división celular a la zona de elongación/diferenciación, lo que resultó en un meristema acortado. Los metales afectaron el equilibrio redox lo cual tuvo consecuencias directas sobre componentes del ciclo celular, bloqueando su progresión y restringiendo el proceso de proliferación celular. En todos los tratamientos se registró aumento de especies activas del oxígeno (EAO) en el ápice radicular y aumento de las proteínas oxidadas. Si bien no se modificaron los niveles de proteína ciclina D y CDKA, se incrementaron sus niveles de carbonilación, conjuntamente con una disminución de la conjugación con ubiquitina. Los tratamientos generaron menor acumulación de transcritos de genes relacionados con la vía Rb/E2F, indicando bloqueo de la transición G1-S del ciclo celular y acumulación de transcritos de expansinas de expresión radicular.

El PEG disminuyó la elongación de la raíces y del coleoptile de manera dependiente a su concentración en el medio, sin modificación del RAM. En los

análisis realizados el día 2 y 3 postimbibición en Ψ_w -0,03 MPa (control) y -0,6 MPa, la restricción hídrica aumentó en la relación raíz/coleptile, disminuyó el contenido de agua en los tejidos, incrementó la expresión radicular de genes de expansinas, aumentó de la actividad específica del par superóxido dismutasa/catalasa, aumentó parámetros relacionados con la producción de ajuste osmótico y no se detectó producción de estrés oxidativo. La comparación de la variedad Buck 75 Aniversario (largo de raíz y coleoptile, peso fresco y seco, actividad de catalasa, contenido de prolina) con otras seis variedades respaldó los datos obtenidos.

De los resultados obtenidos se pudo concluir que, aunque los factores de estrés abiótico suelen agruparse y compartir ciertos componentes fundamentales en los mecanismos de respuesta, las condiciones ambientales adversas afectaron a los procesos de proliferación/expansión involucrados en el crecimiento radicular de manera diferencial. La carbonilación de proteínas consideradas claves para el ciclo celular podría formar parte de un mecanismo mediador del arresto del crecimiento durante el estrés oxidativo, bloqueando el ciclo celular en el momento que podrían ocurrir errores en la replicación o ruptura del ADN (transición G1/S), y de esta forma la célula podría reparar el daño previniendo la propagación de errores. Durante el déficit hídrico, el crecimiento se afectó a través de alteraciones la expansión celular. El ajuste osmótico y el mantenimiento del equilibrio redox en la raíz pueden ser los puntos clave para superar el déficit hídrico moderado y continuar creciendo, aunque a baja velocidad, durante el crecimiento temprano del trigo.